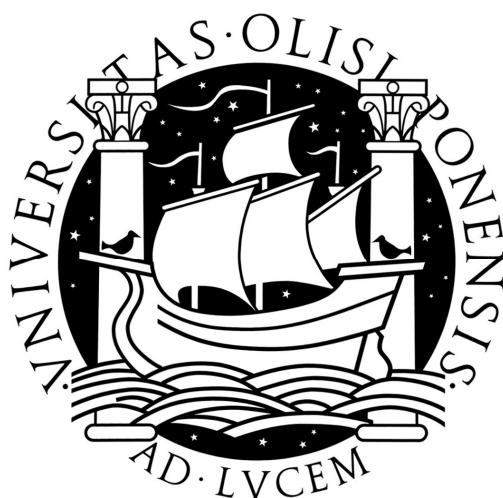


UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**MELANINAS DE ORIGEM MARINHA:  
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E TERMOFÍSICA**

**Marco Filipe Cerqueira Araújo**

Mestrado em Química

2010



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**MELANINAS DE ORIGEM MARINHA:  
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E TERMOFÍSICA**

**Marco Filipe Cerqueira Araújo**

Mestrado em Química

Tese orientada pela Prof.<sup>ª</sup> Doutora Maria Madalena Humanes

2010

## Agradecimentos

Gostava de agradecer a todas as pessoas que me apoiaram e permitiram a execução deste desafiante trabalho.

Entre estas pessoas, agradeço à professora Madalena Humanes, por me ter possibilitado a realização desta tese. Agradeço-lhe a paciência que demonstrou quando eu a ia “chatear” lembrando-lhe para falar com os professores responsáveis para me permitirem utilizar os aparelhos ou ajudar na realização de alguns ensaios. Entre estes professores, tenho que enviar um agradecimento especial à professora Maria José Lourenço (peço desculpa pelo calorímetro!), por me ter possibilitado a realização da análise de calorimetria, à professora Carla Nunes e professor Pedro Vaz, por me terem deixado utilizar o espectrofotómetro UV-Vis de sólidos. Agradeço igualmente ao professor Manuel Rosa Nunes e à professora Anabela Boavida, por me terem também prestado auxílio em alguns ensaios realizados.

Tenho também a agradecer ao Paulo Madeira, por me ter ajudado na realização dos ensaios MALDI, à Doutora Ana Viana, por me ter permitido a utilização do AFM e à Salomé, por me ter ajudado nos ensaios de calorimetria e me ter feito companhia na faculdade aos Sábados de tarde!

À Doutora Olga Iranzo (ITQB), agradeço o facto de me ter possibilitado a realização da Bolsa de Investigação ao mesmo tempo que fazia a tese de mestrado, permitindo-me dividir a semana entre os dois locais de trabalho.

Queria também prestar um agradecimento especial a todos os meus colegas que me deram apoio durante este ano de duro trabalho, especialmente a Tânia Frade, que me aturava sempre que eu passava no laboratório dela a lamentar-me.

Por fim, agradeço à minha família o apoio prestado, especialmente aos meus avós, a quem eu nunca vou conseguir retribuir todo o apoio que me têm dado ao longo da vida. Agradeço também aos meus pais, e à minha irmã por não ter sido tão chata ultimamente. Peço desculpa às reuniões de família que falhei nas férias de Verão e às saídas com os meus primos cabeçudos do norte e de França, mas foi em prol de uma boa causa! Quando ganhar o prémio Nobel, fazemos um jantarinho!

## Resumo

A necessidade de um conhecimento mais aprofundado acerca da estrutura e propriedades das melaninas tendo em vista novas aplicações deste biopolímero, sobretudo em áreas que envolvam elevadas temperaturas, despertou o interesse na realização deste trabalho.

Para o estudo destes pigmentos, procedeu-se ao isolamento e caracterização de melaninas provenientes de dois organismos marinhos, o polvo e choco. Estas melaninas foram submetidas a vários processos de secagem e purificação, tendo-se avaliado a influência destes métodos nas suas propriedades finais. A análise recorrendo a técnicas de caracterização estrutural (espectroscopia IV, espectroscopia UV-Vis) e morfológica (SEM-EDS) permitiu concluir que estes tratamentos não produziram alterações significativas no biopolímero. No estudo das propriedades estruturais, morfológicas e ópticas das melaninas isoladas de fontes naturais, utilizou-se melanina sintética como termo de comparação, tendo-se avaliado a influência dos diferentes processos de (bio)síntese nas propriedades referidas. Concluiu-se que as melaninas de origem natural possuem propriedades acrescidas (nomeadamente ao nível da fotoproteção) comparativamente à melanina sintética, para as quais muito contribuem o aspecto morfológico e estrutural das primeiras.

Neste trabalho também as propriedades termofísicas das melaninas foram alvo de investigação. Do tratamento térmico da melanina extraída da tinta de choco (inicialmente um pó preto e amorfo) até 500 °C, obteve-se um pó branco e cristalino. A análise por difracção de raios-X do material obtido sugere a presença de  $\text{CaCO}_3$  entre outros compostos, não tendo ocorrido uma decomposição total do biopolímero. A análise DSC da melanina isolada da tinta de choco permitiu concluir que este biopolímero é dotado de uma elevada capacidade de armazenamento de calor ( $C_p$  entre  $6 \text{ kJkg}^{-1}\text{K}^{-1}$  e  $10 \text{ kJkg}^{-1}\text{K}^{-1}$ , consoante o grau de hidratação da amostra analisada), possibilitando a sua aplicação em processos que envolvam transferência e armazenamento de calor. O valor de  $\rho C_p$  deste material (entre  $6,7 \text{ Jcm}^{-3}\text{K}^{-1}$  e  $15,2 \text{ Jcm}^{-3}\text{K}^{-1}$ ) revela-se bastante superior ao verificado nos fluidos de transferência de calor correntemente utilizados. A combinação deste material com fluidos que possam ser

utilizados com este propósito (líquidos iónicos), formando ionanofluidos, poderá constituir uma alternativa ambiental e economicamente mais viável.

Estudos de adsorção, recorrendo-se à técnica de espectroscopia UV-Vis, foram ainda realizados na melanina extraída da tinta de choco e seca por liofilização. Os resultados obtidos revelaram uma grande afinidade deste composto para corantes de natureza catiónica, pelo que poderá ser utilizado na descoloração de águas residuais, contaminadas com este tipo de compostos.

Por fim, procedeu-se à síntese de melaninas utilizando-se condições reaccionais distintas, procurando a obtenção de melaninas morfologicamente semelhantes às de origem natural. Quatro processos de síntese foram testados, dos quais três envolviam autooxidação do L-DOPA em diferentes meios reaccionais e um outro oxidação do L-DOPA na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , KI e nanopartículas  $\text{V}_2\text{O}_5$ . A análise espectroscópica (espectroscopia IV) do produto resultante destes processos de síntese indicou a presença de melanina. No entanto, o aspecto morfológico pretendido não foi alcançado.

A reacção que envolveu a oxidação de L-DOPA recorrendo ao uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , KI e nanopartículas  $\text{V}_2\text{O}_5$  apresentou um rendimento razoável (0,62 mg melanina partindo-se de uma solução 1 mM L-DOPA). Desta reacção, importa destacar o carácter catalítico das nanopartículas, o que possibilitou a obtenção de uma quantidade razoável de melanina após 1 dia de reacção. Este período de tempo é considerado curto quando comparado com os métodos de autooxidação do L-DOPA correntemente utilizados, cuja reacção se prolonga por um período entre 3 -8 dias.

Palavras-chave: Cefalópodes, Melanina, Fotoprotecção, Caracterização térmica, Síntese

## Abstract

A better knowledge on the structure and properties of melanins is required for new applications of this material, mainly in fields that require high temperatures.

In this work, we isolated and characterized melanins from two different marine organisms: octopus and cuttlefish. The pigments were dried and purified using different methods, in order to evaluate the influence of these processes in the final properties of the biopolymer. The results obtained by IR, SEM-EDS and UV-Vis analysis showed that the different methods used didn't produce pronounced changes in the biopolymer. In the study of the structural, morphological and optical properties of melanins isolated from natural sources, synthetic melanin was used for comparison purposes. Spectroscopy techniques (IR, UV-Vis), microscopy techniques (SEM-EDS) and mass spectrometry (MALDI) were used, and the obtained results showed that the melanins isolated from marine organisms had enhanced properties (mainly in photoprotecting ability) when compared with synthetic melanin.

This thesis also focuses on the thermophysical properties of melanin, as the behavior of this biopolymer when exposed to heat was investigated. Surprisingly, the thermal treatment (until 500 °C) of melanin isolated from cuttlefish ink, which was initially black and amorphous, produced a white crystalline powder. The results obtained from XRD analysis suggested that besides  $\text{CaCO}_3$ , other compounds are present in the mixture, including melanin that resisted to the thermal treatment.

DSC analysis of melanin isolated from cuttlefish ink suggested that this biopolymer has a considerable capacity of heat storage ( $C$  between  $6 \text{ kJkg}^{-1}\text{K}^{-1}$  and  $10 \text{ kJkg}^{-1}\text{K}^{-1}$ , depending on the hydration degree of the sample), allowing its application in fields that involve heat storage and heat transfer processes. The calculated heat storage capacity by unit of volume for this biopolymer ( $\rho C_p$  between  $6.7 \text{ Jcm}^{-3}\text{K}^{-1}$  and  $15.2 \text{ Jcm}^{-3}\text{K}^{-1}$ ) is greater than the observed for the fluids actually used in heat transfer processes. The combination of this material with ionic liquids, producing ionanofluids, can constitute a greener and more economic alternative to the heat transfer fluids currently used.

Adsorption studies were also done in the melanin extracted from the ink sac of the cuttlefish, regarding an environmental application of this pigment. The studies were done using UV-Vis spectroscopy, and the obtained results revealed that melanin was able to adsorb cationic dyes, indicating a possible application of this biopolymer as decolorizing agent of wastewaters, polluted with this kind of compounds.

In the last chapter of this thesis, we proceeded to the synthesis of melanin, in order to obtain a final compound morphologically similar to the melanin extracted from cuttlefish and the octopus. Four different syntheses were done, three involving the autoxidation of L-DOPA and one the oxidation of L-DOPA in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , KI and  $\text{V}_2\text{O}_5$  nanowires. IR analysis of the obtained product suggested the presence of melanin. However, the morphologic aspect of the synthesized melanins was very different from the one observed for the melanins extracted from the marine organisms.

The yield obtained in the synthesis which involved the oxidation of L-DOPA in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , KI and  $\text{V}_2\text{O}_5$  nanowires was rather good (0.62 mg of melanin starting from a 1 mM L-DOPA solution). In this reaction, it is also important to focus the catalytic behavior of the  $\text{V}_2\text{O}_5$  nanowires, obtaining a fair quantity of melanin after 1 day of reaction. This period of time can be considered short when compared with the methods of L-DOPA autoxidation currently used, which take about 3 to 8 days of reaction in order to achieve the production of melanin in a relatively good yield.

Keywords: Cephalopods, Melanin, Photoprotection, Thermal characterization, Synthesis



## Índice

Capítulo I.....	1
1. Cefalópodes: Da constituição biológica à produção de melanina .....	2
1.1 Alguns aspectos biológicos .....	2
1.2 Constituição .....	3
1.3 Mecanismos de defesa .....	4
1.4 Produção e constituição da tinta .....	5
Capítulo II.....	12
Melaninas de origem natural – À descoberta de novas aplicações tecnológicas.....	12
2. Procedimento Experimental.....	15
2.1 Extracção e secagem das melaninas.....	15
2.1.1 Material biológico .....	15
2.1.2 Extracção das melaninas .....	15
2.1.3 Métodos utilizados na secagem das melaninas.....	16
2.2 Purificação e tratamento térmico das melaninas.....	16
2.2.1 Métodos utilizados na purificação das melaninas .....	16
2.2.2 Tratamento térmico de melaninas.....	18
3. Caracterização estrutural .....	21
3.1 Introdução.....	21
3.2 Espectroscopia de Infravermelho .....	23
3.2.1 Descrição e modo de execução.....	23
3.2.2 Resultados .....	23
3.2 Microscopia electrónica de varrimento com microanálise raios-X -Análise Elementar.....	28
3.2.1 Descrição e modo de execução.....	28
3.2.2 Resultados .....	29
3.3 Espectrometria de massa com ionização a laser assistida por matriz.....	31
3.3.1 Descrição e modo de execução.....	31
3.3.2 Resultados .....	32
3.4 Difracção Raios-X .....	33
3.4.1 Descrição e modo de execução.....	33

3.4.2 Resultados .....	34
3.5 Discussão de Resultados .....	37
4. Caracterização morfológica .....	46
4.1 Introdução.....	46
4.2 Microscopia electrónica de varrimento – Análise morfológica.....	47
4.2.1 Descrição e modo de execução.....	47
4.2.2 Resultados .....	47
4.3 Microscopia Electrónica de Transmissão.....	51
4.3.1 Descrição e modo de execução.....	51
4.3.2 Resultados .....	52
4.4 Microscopia de Força Atómica .....	53
4.4.1 Descrição e modo de execução.....	53
4.4.2 Resultados .....	53
4.5 Discussão de resultados.....	54
5. Propriedades Ópticas .....	57
5.1 Introdução.....	57
5.2 Espectroscopia de Ultravioleta-Visível .....	58
5.2.1 Descrição e modo de execução.....	58
5.2.2 Resultados .....	59
5.3 Discussão de resultados.....	61
6. Propriedades térmicas.....	64
6.1 Introdução.....	64
6.2 Análise de perda de massa .....	65
6.2.1 Descrição e modo de execução.....	65
6.2.2 Resultados .....	65
6.3 Calorimetria diferencial de varrimento .....	67
6.3.1 Descrição e modo de execução.....	67
6.3.2 Resultados .....	68
2.6.4 Discussão de resultados.....	70
7. Estudos preliminares como descontaminante de águas residuais .....	72
7.1 Introdução.....	72

7.2 Parte experimental .....	73
7.3 Resultados.....	73
7.4 Discussão.....	75
Capítulo III.....	76
Melaninas Sintéticas.....	76
1. Introdução .....	77
2. Parte experimental.....	79
2.1 Síntese MS1.....	80
2.2 Síntese MS2.....	80
2.3 Síntese MS3.....	81
2.4 Síntese MN .....	82
3. Resultados .....	82
3.1 Espectroscopia de Infravermelho .....	82
3.2 Microscopia Electrónica de Varrimento .....	83
3.3. Estudo da reacção MN por espectroscopia UV-Vis .....	84
4. Discussão de resultados .....	86
Capítulo IV .....	88
Conclusões e Perspectivas Futuras.....	88
Bibliografia.....	91

## Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema representativo das subclasses e ordens mais comuns da classe dos Cefalópodes <sup>[1]</sup> .....	2
Figura 2 - Representação esquemática da anatomia do polvo (esquerda) e do choco (direita) <sup>[3]</sup> .....	3
Figura 3 - Nuvem opaca de tinta de polvo formada em meio aquático .....	5
Figura 4 - Representação esquemática do saco de tinta do choco.....	5
Figura 5 - Metabolismo da tirosina na glândula de tinta do choco.....	6
Figura 6 - Estrutura das unidades monoméricas da eumelanina.....	7
Figura 7 - Descrição fotográfica resumida do processo de obtenção dos sacos de tinta do choco e do polvo .....	15
Figura 8 - Estrutura dos ácidos pirrolo-2,3,5-tricarboxílico e pirrolo-2,3-carboxílico ...	21
Figura 9 -Representação da molécula de DHI e as suas formas oxidadas SQ e IQ.....	22
Figura 10 -Modelos de polimerização propostos para as eumelaninas.....	22
Figura 11 - Espectros IV melaninas extraídas do choco (MChL), polvo (MPL) e comercial (MCO).....	24
Figura 12 - Espectros IV melanina extraída do choco liofilizada não purificada (MChL), liofilizadas e submetidas a digestão ácida (MChHF e MPHF), digestão química (MChDQ e MPDQ) e digestão enzimática (MChDE e MPDE) .....	25
Figura 13 - Espectros IV melanina extraída do polvo liofilizada não purificada (MPL), liofilizada e submetida a digestão ácida (MPHF), digestão química (MPDQ) e digestão enzimática (MPDE) .....	25
Figura 14 - Espectros IV da amostra MChL tratada termicamente (Aquecimento 1) até 500 °C.....	26
Figura 15 – Espectros IV de amostras melanina do choco resultantes de diferentes condições de aquecimento de MChL .....	28
Figura 16 -Espectros de massa MALDI das amostras MChDE (A) e MCO (B) .....	32
Figura 17 -Difractogramas das amostras de melanina de partida MChL (A) e MPL (C) e das resultantes do tratamento térmico correspondente ao Aquecimento 2, MChB (B) e MPLB (D) .....	34
Figura 18 - Difractogramas amostras MChL200 (A), MChL300 (B), MChL400 (C).....	35

Figura 19 - Difractogramas das amostras MChL6 (A), MChL6H_500 (B), MCh500_24 (C) e MCh500_72 (D).....	36
Figura 20 - Difractograma da amostra MChCinz .....	37
Figura 21 - Esquema de degradação oxidativa de DHI e DHICA a PDCA e PTCA.....	39
Figura 22 - Estruturas propostas com massa 801,05 Da para a melanina MChDE. ....	40
Figura 23 - Representação esquemática do processo inicial de agregação da melanina (modelo oligomérico) .....	46
Figura 24 - Imagens SEM amostras MChL, MCO e MPL. ....	47
Figura 25 - Imagens SEM amostras MCh100, MChL e MChAr .....	48
Figura 26 - Imagens SEM amostras MChL, MChDE, MChDQ, MChHF.....	49
Figura 27 - Imagens SEM amostras MPL, MPDE, MPDQ, MPHF. ....	49
Figura 28 - Imagens SEM amostras MChL, MChL500_6H, MPL, MPLB.....	50
Figura 29 - Imagens SEM amostras submetidas a diferentes tempos de aquecimento MChL500_24, MChL500_48, MChL500_72.....	51
Figura 30 - Imagens TEM amostra MChL e MChL500_6H.....	52
Figura 31 - Imagens AFM da amostra MChL e MChL500_6H.....	54
Figura 32 - Esquema de geração e captação de radicais livres .....	58
Figura 33 – Espectro UV-Vis das melaninas naturais extraídas da tinta de choco (nativa e modificadas) e melanina sintética .....	60
Figura 34 - DSC melaninas submetidas a diferentes métodos de secagem.....	69
Figura 35 - Espectros de absorção das soluções de violeta de cristal e azul de metileno antes e após reacção com a amostra MChL (A); espectro de absorção da melanina em solução (B). ....	74
Figura 36 - Espectros de absorção da solução de “naphtol blue black” antes e após reacção com a amostra MChL. ....	74
Figura 37 - Estruturas do violeta de cristal, azul de metileno e “naphtol blue black” ..	75
Figura 38 - Centro activo das haloperoxidasas de vanádio.....	79
Figura 39 - Esquema reaccional síntese MS1 .....	80
Figura 40 - Esquema reaccional síntese MS2 .....	80
Figura 41 - Esquema reaccional síntese MS3 .....	81
Figura 42 - Esquema reaccional síntese MN .....	82

Figura 43 - Espectros IV melaninas sintéticas e melanina de origem natural (amostra MChAr).....	82
Figura 44 - Imagens SEM das melaninas sintéticas MS1, MS2, MS3, MN.....	84
Figura 45 - Estudo espectroscópico da reacção do L-DOPA com nanopartículas $V_2O_5$ e sem nanopartículas .....	84
Figura 46 - Representação estrutural do Iododopacromo.....	85
Figura 47 - Reacção de oxidação do Iodeto (A) e formação da espécie $I_3^-$ (B).....	86

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Frequências e modos normais de vibração observados nas melaninas MChL, MPL e MCO .....	24
Tabela 2 - Frequências e modos normais de vibração observados na melanina do choco tratada termicamente .....	27
Tabela 3 - Análise elementar das melaninas do choco e do polvo purificadas, não purificadas e melanina comercial.....	29
Tabela 4 - Análise elementar das melaninas do choco e do polvo sujeitas a tratamento térmico.....	30
Tabela 5 - Comparação entre os picos registados na análise MALDI da amostra MChDE e valores encontrados na bibliografia, provenientes da análise MALDI de melaninas extraídas da tinta de choco .....	33
Tabela 6 - Perda de massa da melanina MChL ao longo do Aquecimento 1 .....	66
Tabela 7 - Perdas de massa obtidas para amostras submetidas a diferentes condições de aquecimento.....	66
Tabela 8 - Capacidade calorífica p/ unidade de volume das melaninas submetidas a diferentes métodos de secagem .....	69
Tabela 9 - Composição da água do mar sintética.....	81
Tabela 10 - Bandas presentes no espectro IV das melaninas sintetizadas e modos de vibração correspondentes.....	83

## Símbolos

mg	miligrama
g	grama
<i>g</i>	<i>g</i> 's (unidade de centrifugação)
nm	nanometro
$\lambda$	comprimento de onda
$\mu\text{J}$	microjoule
Å	Angstrom
kV	Kilovolt
KeV	Kiloelectrovolt
KHz	Kilohertz
Hz	Hertz
m	massa
<i>z</i>	carga do ião
Da	Dalton
kj	Kilojoule
kg	kilograma
K	Kelvin
Cp	calor específico
$\rho$	densidade
pka	constante de acidez
<i>t</i> <sub>a</sub>	temperatura ambiente



## Acrónimos

SEM	Microscopia electrónica de varrimento ( <i>Scanning electron microscopy</i> )
TEM	Microscopia electrónica de transmissão ( <i>Transmission electron microscopy</i> )
AFM	Microscopia de força atómica ( <i>Atomic force microscopy</i> )
HRTEM	Microscopia electrónica de transmissão de alta resolução ( <i>High-resolution transmission electron microscopy</i> )
UHRSEM	Microscopia electrónica de varrimento de alta resolução ( <i>High-resolution scanning electron microscopy</i> )
STM	Microscopia de varrimento e efeito túnel ( <i>Scanning tunneling microscopy</i> )
IV	Radiação infravermelha
UV-VIS	Radiação ultravioleta-visível
MALDI	Espectrometria de massa com ionização a laser assistida por matriz ( <i>Matrix assisted desorption ionization mass spectrometry</i> )
TOF	Analisador tempo de voo ( <i>Time of flight</i> )
NMR	Ressonância magnética nuclear ( <i>Nuclear magnetic resonance</i> )
SAXS	Dispersão de raios-x de ângulo raso ( <i>Small angle X-ray scattering</i> )
WAXS	Dispersão de raios-x de ângulo amplo ( <i>Wide angle X-ray scattering</i> )
DFT	Teoria da densidade funcional ( <i>Density function theory</i> )
L-DOPA	L- 3,4 - dihidroxifenilalanina ( <i>L-3,4-dihydroxyphenylalanine</i> )
DHI	5,6 – dihidroxindolo ( <i>5,6 – Dihydroxyindole</i> )

## Melaninas de origem marinha: Caracterização Química e Termofísica

DHICA	Ácido 5,6-dihidroindolo carboxílico (5,6 – <i>dihydroxyindole carboxilic acid</i> )
PTCA	Ácido pirrolo-2,3,5-tricarboxílico ( <i>Pyrrole-2,3,5-tricarboxilic acid</i> )
PDCA	Ácido pirrolo-2,3-carboxílico ( <i>Pyrrole-2,3-dicarboxylic acid</i> )
SQ	Semiquinona
IQ	Indolequinona
FEG-SEM	Microscopia electrónica de varrimento com canhão de emissão de campo ( <i>Field Emission Gun Scanning Electron Microscope</i> )
FTICR	Ressonância iónica de ciclotrão com transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i> )
DRX	Difracção de raios-X
DSC	Calorimetria Diferencial de Varrimento ( <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )
CV	Violeta de cristal ( <i>Crystal violet</i> )
MB	Azul de metileno ( <i>Methylene blue</i> )
NBB	Naphtol blue black ( <i>Naphtol blue black</i> )
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa ( <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão ( <i>High pressure liquid chromatography</i> )

# Capítulo I

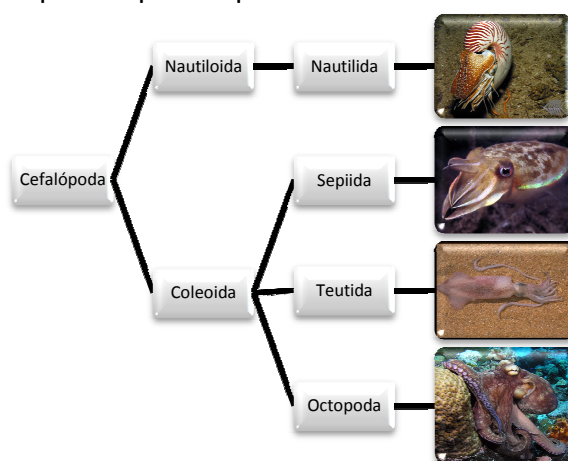
## Introdução

# 1.Cefalópodes: Da constituição biológica à produção de melanina

## 1.1 Alguns aspectos biológicos

Os cefalópodes, classe onde figuram os animais invertebrados com maior inteligência e rapidez do meio marinho, pertencem ao *filo* Molusco. Os moluscos marinhos constituem os principais representantes da classe dos cefalópodes, cuja divisão assenta em dois grandes grupos: *Nautiloidea* e *Coleoidea* [1].

A distinção entre estes dois grupos baseia-se essencialmente ao nível da fisionomia dos organismos que os representam, onde a presença ou ausência de um saco de tinta constitui uma das principais divergências. Além deste órgão, os organismos pertencentes ao último grupo dispõem também de um escudo interno que ajuda nas suas funções de defesa, bem como de um menor número de tentáculos ou braços. Por outro lado, também na capacidade de locomoção e camuflagem se verificam acentuadas diferenças entre os organismos pertencentes às classes anteriormente enunciadas. Todas estas características contribuem para uma maior capacidade de defesa dos elementos pertencentes à classe *Coleoidea*, justificando a maior quantidade de espécies que a representam.



**Figura 1** - Esquema representativo das subclasses e ordens mais comuns da classe dos Cefalópodes<sup>[1]</sup>

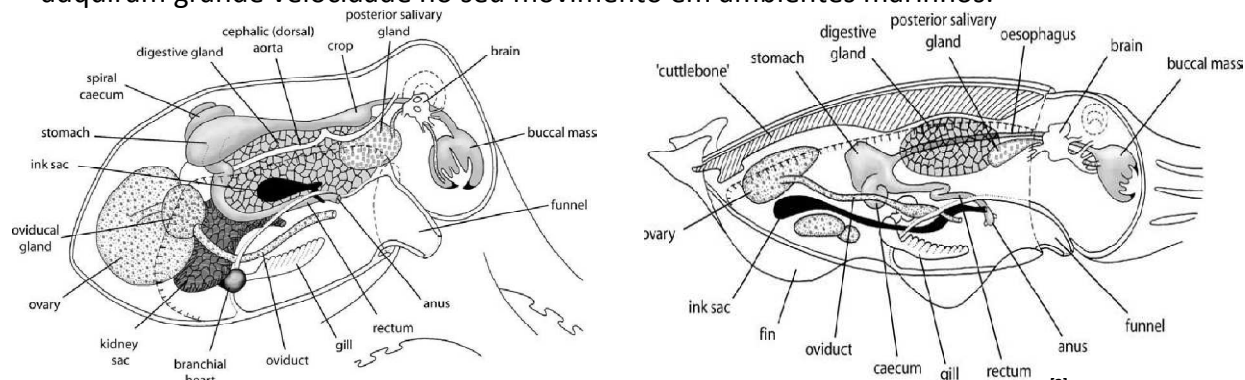
Os organismos marinhos considerados ao longo deste trabalho são o polvo e o choco, os quais pertencem à classe *Coleoidea*, ordens Sepiida e Octopoda, respectivamente (Figura 1). Estes seres têm o seu habitat na maioria dos ambientes marinhos, desde os mares polares até aos trópicos. A sua disponibilidade e abundância

justificam a grande importância económica destes organismos para as indústrias de pesca.

## 1.2 Constituição

No que se refere ao aspecto exterior, os cefalópodes são dotados de tentáculos ou braços e de um sistema visual e sensorial bastante evoluído, características que acopladas ao seu desenvolvido e complexo sistema nervoso contribuem para um aumento das suas capacidades de ataque e de defesa [2]. Estas poderão manifestar-se através da mudança de forma, textura e capacidade de camuflagem do animal, esta última induzida pelos cromatóforos e órgãos luminescentes que estes organismos têm na sua constituição [3].

A locomoção destes seres vivos é favorecida pela presença de um funil que dá acesso ao exterior do organismo (Figura 2). A locomoção por “jet-propulsion”, realizada através da libertação de fortes jactos de água através de uma cavidade de pequeno diâmetro localizada na ponta do funil, faz com que estes seres vivos adquiram grande velocidade no seu movimento em ambientes marinhos.



**Figura 2** - Representação esquemática da anatomia do polvo (esquerda) e do choco (direita) [3]

Na realização deste trabalho, torna-se fundamental destacar a localização do saco de tinta nestes dois organismos. Este órgão, também apelidado de bexiga muscular, encontra-se localizado nas proximidades do ânus, adjacente ao funil que dá acesso ao exterior do organismo [3]. Deste modo, enquanto no choco o saco de tinta se situa na parte inferior do organismo, no polvo este ocorre na parte central, inserido na glândula digestiva. Além da distinta localização, também o tamanho do saco diverge do polvo para o choco, sendo este último dotado de um saco de maior dimensão.

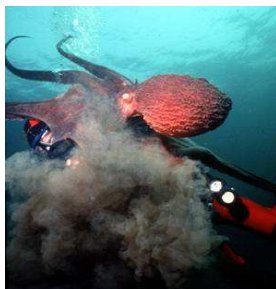
### 1.3 Mecanismos de defesa

A necessidade de sobrevivência por parte dos seres vivos faz com que estes desenvolvam mecanismos capazes de facilitar a sua fuga ou provocar danos no predador. Estas acções são designadas de mecanismos de defesa, os quais poderão ser de origem química ou biológica, dependendo da espécie e do habitat que a rodeia.

No que se refere ao choco e ao polvo, estes mecanismos manifestam-se não só ao nível da sua variação de forma ou de cor (camuflagem), mas também da libertação de uma tinta preta de elevada densidade para o exterior do seu organismo.

A capacidade de camuflagem por parte do polvo e do choco advém das células pigmentadas que se encontram distribuídas ao longo da parte exterior do seu organismo. Estas células são designadas de cromatóforos, e são controladas através do relaxamento ou contracção dos músculos que as rodeiam. O evoluído sistema visual e sensorial destes organismos, composto por olhos de grande dimensão e por receptores diversificados (mecano, quimio e fotoreceptores), permite-lhes não só detectar a aproximação de uma presa ou predador, como também recolher informação acerca do habitat que os rodeia. No acto da camuflagem, o cérebro envia um sinal que provoca a contracção dos músculos que rodeiam as células pigmentadas e consequentemente, a libertação de um pigmento que os torna congéneres com o habitat que os rodeia.

No que se refere ao outro mecanismo de defesa enunciado, a libertação de tinta encontra-se controlada pelo sistema nervoso do animal. Assim, na presença de um predador, os cefalópodes pertencentes à classe *Coleoidea* têm a capacidade de comprimir o seu saco de tinta, libertando uma quantidade considerável de um composto de coloração preta para o meio aquático. A forma como esta tinta constitui um mecanismo de defesa traduz-se pela sua densidade e capacidade de agregação em meio marinho, formando uma nuvem intensa que se assemelha a um “pseudomorfo” e que capta a atenção do predador [4]. A formação desta nuvem de elevada densidade possibilita uma fuga rápida da presa, em virtude da reduzida dispersão da tinta pelo meio aquático (Figura 3).

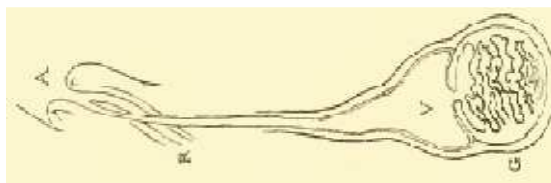


**Figura 3** - Nuvem opaca de tinta de polvo formada em meio aquático [68]

Por outro lado, a libertação da tinta poderá também constituir uma forma de comunicação, funcionando muitas vezes como um sinal de alarme para os cefalópodes que se encontrem nas proximidades e reduzindo o risco de serem capturados mediante a presença de um predador [2,5].

### 1.4 Produção e constituição da tinta

A produção da tinta nos cefalópodes pertencentes à classe *Coleoidea* ocorre exclusivamente ao nível do seu saco de tinta. As glândulas de tinta, localizadas na parte interior do saco (particularmente na sua parte inferior), são as grandes responsáveis pela produção contínua do pigmento de coloração preta que o animal acumula no reservatório vesicular (Figura 4) [6].



**Figura 4** - Representação esquemática do saco de tinta do choco. G corresponde à glândula de tinta, rodeada pelo epitélio pigmentado; V designa o reservatório vesicular; R e A correspondem ao recto e ânus, respectivamente [7]

Ao nível da constituição, os sacos de tinta do choco e do polvo não apresentam diferenças significativas, apesar das distintas dimensões e formas que possuem. Deste modo, é provável que o processo de produção de tinta nos dois organismos seja relativamente semelhante [7].

Ambos os sacos têm na sua constituição uma glândula de tinta, a qual se encontra dividida em três zonas distintas: uma zona interior composta por células imaturas e não pigmentadas; uma zona exterior onde predominam células com um avançado grau de maturação, localizadas próximas do lúmen; e uma outra zona igualmente exterior, onde figuram organelos específicos onde ocorre a síntese do pigmento preto - melanossomas.

A este pigmento preto, o qual se revela o principal componente da tinta do choco e do polvo, dá-se o nome de melanina. Além deste composto, a tinta apresenta também na sua composição outros dois constituintes: L-DOPA e dopamina. Uma vez que ambos são derivados da tirosina, composto de partida no processo de biossíntese da melanina, coloca-se a hipótese da ocorrência de dois tipos de metabolismo na fracção exterior da glândula de produção de tinta, catalisados por diferentes tipos de enzimas. Enquanto um dos metabolismos poderá ter como finalidade a síntese da dopamina, por acção das enzimas tirosina hidroxylase e dopa decarboxilase, o outro poderá conduzir à produção de melanina, catalisada pela enzima tirosinase (Figura 5).

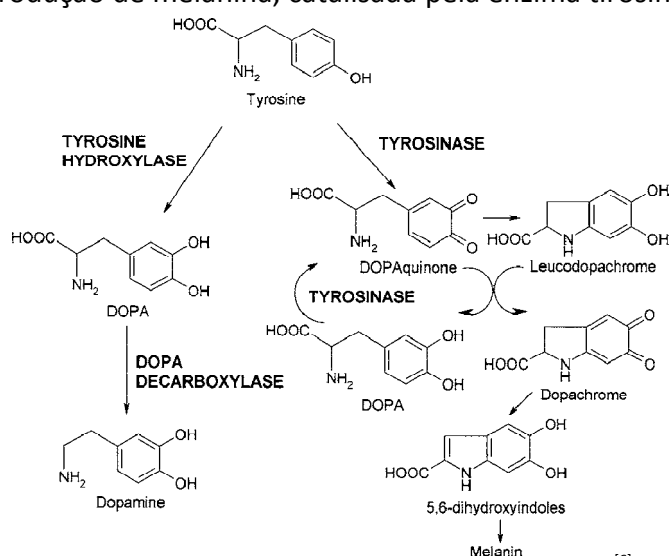
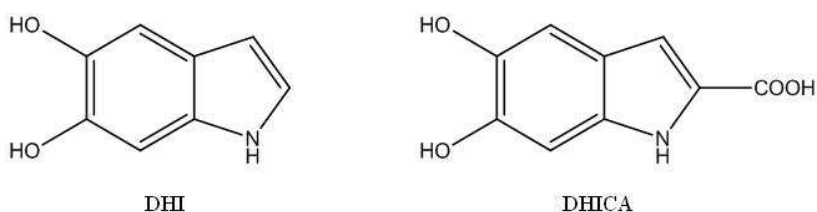


Figura 5 - Metabolismo da tirosina na glândula de tinta do choco [6]

No processo de biossíntese do pigmento preto, ocorre a conversão de tirosina em L-Dopa e deste último em dopaquinona, por acção da enzima tirosinase. Perfilando-se como um intermediário bastante instável, a dopaquinona sofre um processo de ciclização que tem como produto final o dopacromo, composto de coloração vermelha de relativa estabilidade. Nesta fase, o mecanismo de formação da melanina poderá enveredar por duas vias distintas, dependendo da presença ou ausência da enzima dopacromo tautomerase. Enquanto a presença desta enzima promove a tautomerização ceto-enólica deste último intermediário, favorecendo a formação do derivado carboxílico do 5,6-dihidroxiindolo (ácido 5,6-dihidroxiindolo carboxílico (DHICA)), a sua ausência promove a redução e descarboxilação do dopacromo, originando o 5,6-dihidroxiindolo (DHI) (Figura 6) [8, 9]. Deste modo, pode-



se concluir que a presença da enzima dopacromo tautomerase é responsável pelo ratio dos monómeros DHI ou DHICA na composição do produto final.



**Figura 6** - Estrutura das unidades monoméricas da eumelanina

No que à produção de dopamina diz respeito, pensa-se que a presença deste composto desempenhe um papel fundamental no comportamento da tinta quando libertada no meio aquático, promovendo a sua agregação e, conseqüentemente, a formação de uma nuvem de tinta bastante densa e opaca. No final do processo de maturação, as células pigmentadas (melanossomas) libertam a melanina nas proximidades do lúmen, local onde se localizam as células maduras que contêm a enzima tirosinase e a dopamina. A adsorção deste composto aos grânulos de melanina libertados impede a dispersão da tinta em meio aquoso, provavelmente através de pontes de hidrogénio que se possam formar entre a dopamina e as unidades constituintes do pigmento. No entanto, a presença de dopamina na tinta segregada poderá desempenhar outras funções. Considerada um neurotransmissor, a dopamina poderá promover a comunicação entre espécies, interagindo com receptores específicos no momento em que a tinta é expelida e, conseqüentemente, lançando um sinal de alerta sobre o ecossistema envolvente [2, 6]. Por outro lado, a presença de elevadas quantidades de dopamina e tirosinase na tinta libertada poderá originar a produção de quinonas, que por sua vez, poderão revelar-se tóxicas para os predadores.

Apesar dos vários compostos que constituem a tinta de choco e do polvo, o facto de a melanina prevalecer como componente maioritário faz com que estes organismos sejam habitualmente eleitos como fonte principal de eumelaninas de origem natural, o que justifica a sua utilização na execução deste trabalho.

## 2. Melaninas: Descrição geral e aplicações

### 2.1. Definição e Propriedades

Amplamente distribuídas pela natureza e organismos vivos, as melaninas podem ser descritas como uma classe de biomacromoléculas funcionais [10] ou, alternativamente, uma relevante classe de pigmentos [11]. Por pigmento entende-se qualquer composto que dá cor aos animais e plantas, absorvendo selectivamente a radiação [12].

A distribuição destes biopolímeros - material de origem biológica, formado por unidades que se repetem ao longo da sua estrutura - pela natureza é bastante diversificada, abrangendo praticamente todas as classes filogénicas, desde fungos e bactérias até aos mamíferos e, inclusive, o Homem [13].

De acordo com a sua coloração e composição estrutural, as melaninas poderão ser divididas em três grandes grupos:

- Eumelaninas – Compostas por unidades monoméricas de natureza indólica derivadas da L-tirosina, apresentam coloração preta ou castanha;
- Feomelaninas – Formadas por unidades de benzotiazina derivadas da oxidação do cisteinildopa, exibem coloração amarela ou vermelha;
- Neuromelaninas – Igualmente detentoras de uma coloração preta, estas melaninas são consideradas uma mistura dos dois tipos de melanina anteriores, contendo na sua composição unidades de natureza indólica e de benzotiazina.

Estes pigmentos desempenham um papel fotoprotector importante, não só nos humanos, mas também noutros organismos [10], sendo esta a principal função que lhes é atribuída. Porém, para além desta função, a melanina poderá intervir em muitos outros processos, entre eles:

- Termoregulação - resultante da capacidade de conversão de energia fotónica em calor.
- Camuflagem - resultado das suas diversas colorações

- Efeito de protecção - a afinidade para determinadas moléculas bioactivas possibilita a sua utilização como sistema de transporte e libertação desses compostos em diferentes locais do organismo (“drug delivery”); revela também uma elevada capacidade de complexação de metais, protegendo as células de possíveis danos citotóxicos por eles causados.
- Efeito antioxidante - apresenta uma elevada capacidade de captação de radicais livres [14]

No entanto, o estudo das melaninas é bastante dificultado pelas suas características. A elevada insolubilidade tanto em meios orgânicos como aquosos limitam as técnicas de caracterização disponíveis, perfilando-se as técnicas de estado sólido como as mais adequadas para uma caracterização global do pigmento. Técnicas de caracterização em solução têm sido utilizadas, por vezes, no estudo de soluções de melanina em meios fortemente alcalinos. No entanto, nestas situações, o estudo estrutural do biopolímero fica restrito aos pequenos oligómeros provenientes do processo de hidrólise básica [15].

Por outro lado, torna-se importante referir que as melaninas exibem interessantes propriedades electrónicas, donde se destacam o seu paramagnetismo (consequência do mecanismo radicalar envolvido na formação destes pigmentos) e comportamento de semicondutor amorfo [16, 17]. Apesar das inúmeras propriedades reveladas pelas melaninas, torna-se importante realçar que estas poderão variar consoante o tipo de melanina que se está a considerar, dependendo fortemente das vias (bio)sintéticas de onde provêm [18].

Ao longo deste trabalho, o tipo de melanina estudado foi a eumelanina, principal componente da tinta do choco e do polvo. A razão desta escolha prende-se não só com a possibilidade de obtenção deste tipo de melanina em quantidades suficientes para a realização dos vários ensaios, mas também com o facto de o componente maioritário da tinta do choco e do polvo ser a melanina, o que facilita o método de extracção, preservando a estrutura nativa do biopolímero. Deste modo, ao longo deste trabalho, o termo melanina deverá corresponder essencialmente à eumelanina.

A melanina extraída do saco de tinta do choco, habitualmente designada por “*Sepia melanin*”, tem sido utilizada como modelo das eumelaninas naturais no que se refere a estudos espectroscópicos, de fotoreactividade e de morfologia [19, 20].

## **2.2 Aplicações das melaninas**

O interesse nestes impressionantes pigmentos resulta maioritariamente das suas inúmeras propriedades, permitindo a sua utilização numa vasta gama de aplicações a nível tecnológico. Exemplos destas aplicações poderão incluir áreas como o fabrico de sensores, materiais fotoprotectores, optoelectrónica e armazenamento de energia, dispositivos fotovoltaicos ou de aquecimento solar térmico [21, 22].

Nas últimas décadas as melaninas de origem natural, particularmente a eumelanina, têm sido alvo dos mais diversos estudos. Vários tipos de microscopia (SEM, TEM, AFM, HRTEM, UHRSEM, STM) e espectroscopia (IV, UV-Vis, MALDI-TOF, NMR) têm sido utilizados no estudo das suas propriedades morfológicas e estruturais [20]. Do mesmo modo, técnicas de “scattering” de raios-X (SAXS, WAXS) e cálculos teóricos (DFT) têm sido igualmente aplicadas no estudo da composição e arranjo estrutural das melaninas [23].

No entanto, os resultados obtidos a partir destes estudos têm sido, na sua maioria, contraditórios, prevalecendo a ausência de um acordo quanto á função e estrutura das melaninas. As discrepâncias verificadas derivam de vários factores, entre os quais se destacam os procedimentos de preparação e isolamento do pigmento e a sua origem. Deste modo, torna-se importante perceber o grau de influência destes factores ao nível do arranjo estrutural e morfológico do pigmento, de forma a estabelecer um modelo de estudo das suas propriedades [20].

Um dos principais objectivos que se impõe na maioria dos estudos que envolvem moléculas biológicas baseia-se na compreensão da relação existente entre a sua estrutura e as suas propriedades macroscópicas, visando uma maior área de aplicação destes materiais. No que se refere ao estudo das melaninas, este tem sido igualmente um desafio abordado por várias equipas de investigação, cuja resolução continua ainda longe de um acordo entre a comunidade científica.

A construção de uma relação entre as propriedades das melaninas e a sua composição estrutural e organização morfológica poderá constituir um passo importante na descoberta de novos horizontes nas aplicações tecnológicas deste biopolímero. Neste trabalho investiu-se no estudo das propriedades termofísicas da melanina, tentando expandir as suas aplicações tecnológicas a áreas onde materiais com elevada capacidade de armazenamento de calor e resistência a altas temperaturas são fundamentais.

A capacidade de conversão da energia fotónica em calor é uma característica fundamental em materiais que sejam utilizados em processos térmicos que exijam grande capacidade de acumulação e permuta de calor. O estudo das melaninas neste campo poderá ser determinante na procura de novos materiais com maior eficiência e menos prejudiciais para o ambiente.

Por outro lado, a melanina proveniente do choco e do polvo é um desperdício da indústria da pesca, o que a torna uma fonte sustentável de matéria-prima, promovendo um interesse acrescido no estudo das propriedades e possíveis aplicações deste biopolímero.

## Capítulo II

# **Melaninas de origem natural – À descoberta de novas aplicações tecnológicas**

## 1. Preâmbulo

Como já foi referido no capítulo I, o processo de formação da melanina ocorre nos melanossomas com um avançado grau de maturidade. Numa fase inicial, os melanossomas são essencialmente constituídos por uma matriz de proteína ligada a uma película membranar [24]. O envolvimento desta matriz de proteína nas células produtoras de melanina poderá justificar o facto de, nos sistemas biológicos, a melanina se apresentar vulgarmente associada a uma fracção proteica, que no caso da tinta de choco constitui cerca de 6-8% de proteína, em massa [20].

Deste modo, no que se refere a melaninas de origem natural, o termo *melanina* deverá englobar não só o cromóforo, mas também a fracção proteica agregada, embora vários estudos que envolvem melaninas naturais ignorem esta fracção. As consequências provocadas pela presença da fracção proteica nas propriedades finais do pigmento continuam ainda por desvendar. No entanto, a possibilidade de intervenção directa de meios proteicos no arranjo estrutural e morfológico do pigmento não pode ser descartada, podendo-lhes ser atribuídas funções de suporte (actuando como matriz para deposição da melanina formada nos melanossomas) e de catálise (actuando como iniciadores e catalisadores do processo de polimerização) [25].

Esta possível influência de meios proteicos nas propriedades físico-químicas das melaninas torna necessário o desenvolvimento de métodos de extracção que permitam obter o pigmento na sua forma mais pura e que, paralelamente, mantenham a sua estrutura nativa. Neste contexto, a influência de vários processos de isolamento de melaninas de fontes naturais na morfologia e estrutura final do pigmento foi alvo de estudo.

Por outro lado, estudos realizados acerca do processo de preparação do pigmento revelaram que, também o método de secagem utilizado influencia a morfologia final do biopolímero [19]. A utilização de diferentes métodos de secagem permite a obtenção de melaninas com diferente grau de agregação e,

consequentemente, com porosidade distinta, mantendo a sua composição química inicial [18, 20].

Tendo em conta o conhecimento adquirido sobre estes temas, a primeira parte deste trabalho consistiu na extracção da melanina da tinta do choco e do polvo, sendo o “pellet” obtido submetido a três métodos de secagem distintos: secagem ao ar por um período de 25 horas, secagem em estufa à temperatura de 100 °C (25 horas) e, por último, secagem por liofilização. É conhecido o facto de o grau de hidratação da melanina influenciar as propriedades físicas e estruturais, produzindo especial impacto nas suas propriedades electrónicas [26]. No entanto, o grau de hidratação das melaninas poderá também ter influência nas suas propriedades térmicas e fotoprotectoras. Assim, o estudo realizado ao longo desta tese no que se refere à utilização de diferentes métodos de secagem da melanina isolada da tinta de choco teve como objectivo primário a obtenção de uma melanina com eficiência térmica e fotoprotectora acrescidas.

Numa segunda fase, dada a importância do estudo da fracção cromófora da melanina, insistiu-se na procura de métodos de purificação de melaninas que mantivessem a estrutura nativa do biopolímero.

Além da interferência dos processos preparativos na estrutura e morfologia final das melaninas, também a origem da própria melanina poderá influenciar estes parâmetros. Deste modo, as eumelaninas extraídas do polvo e do choco foram, sempre que possível, comparadas entre si quanto às suas propriedades.

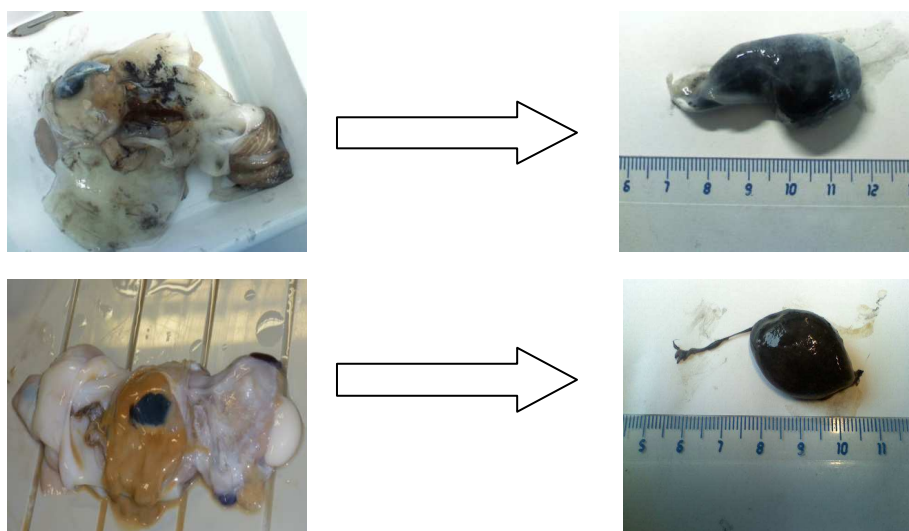


## 2. Procedimento Experimental

### 2.1 Extracção e secagem das melaninas

#### 2.1.1 Material biológico

Chocos e polvos foram adquiridos numa peixaria e dissecados ainda frescos, retirando-se os respectivos sacos de tinta. Estes foram armazenados em sacos de plástico fechados, e conservados a -30 °C durante a noite, tendo-se no dia seguinte procedido à extracção da melanina.



**Figura 7** - Descrição fotográfica resumida do processo de obtenção dos sacos de tinta do choco (cima) e do polvo (baixo)

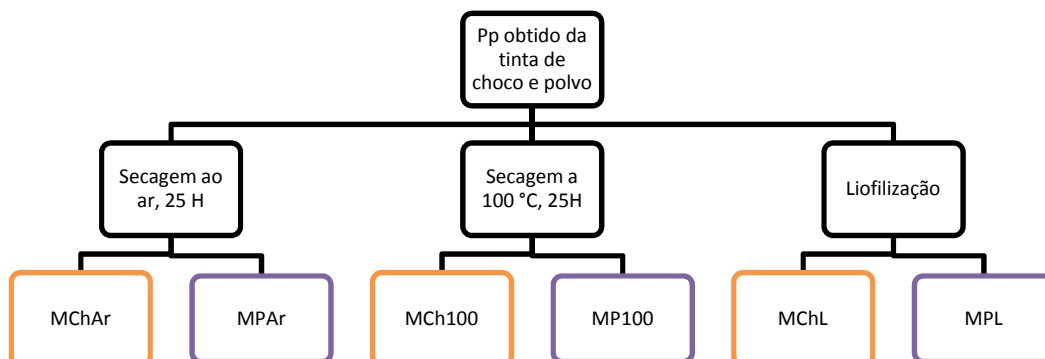
#### 2.1.2 Extracção das melaninas

Os sacos de tinta obtidos da dissecação do choco e do polvo foram separados em recipientes de polycarbonato distintos. Com a ajuda de um bisturi procedeu-se à abertura dos sacos, tendo a extracção da respectiva tinta sido auxiliada com água Milli-Q.

A mistura presente em cada recipiente foi posteriormente centrifugada (13 000 g, 15 min), e o “pellet” resultante lavado com água Milli-Q (6 x 15 mL). A secagem do precipitado final obtido foi realizada seguindo diferentes metodologias, descritas na secção 2.1.3.

### 2.1.3 Métodos utilizados na secagem das melaninas

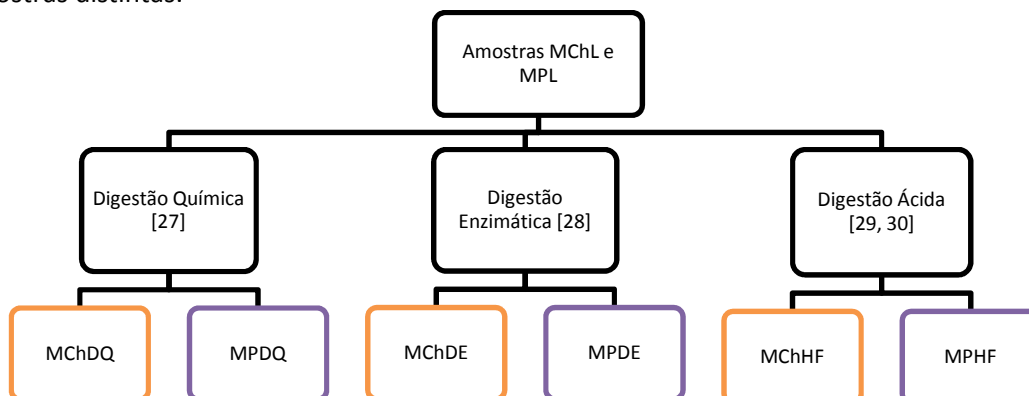
De forma a estudar a influência dos métodos de secagem da melanina nas suas propriedades finais, procedeu-se à secagem ao ar e a 100 °C de parte do precipitado obtido da tinta de choco e do polvo, por um período de 25 horas. A restante fracção foi liofilizada. Da realização destes métodos de secagem resultaram 6 amostras.



## 2.2 Purificação e tratamento térmico das melaninas

### 2.2.1 Métodos utilizados na purificação das melaninas

Na tentativa de se obter melanina numa forma mais pura (i.e. separada da parte proteica), uma pequena fracção das amostras MChL e MPL (3 g) foi sujeita a diferentes processos de digestão (química, enzimática e ácida), tendo-se obtido destes tratamentos 6 amostras distintas.



#### ➤ Digestão Química

A primeira parte do processo de digestão química consistiu na suspensão de 3 g de melanina numa mistura de  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_2\text{OH}$  (2:1) e consequente agitação por um período de 24 horas, de modo a retirar compostos apolares (por exemplo, lípidos) que se encontrem ligados à melanina.

O precipitado foi recuperado por centrifugação (13000 *g*, 15 min), tendo posteriormente sido suspenso em 55 mL de uma solução contendo: 25 mM Tris-HCl, pH 8,5, 2,4 M tioureia, 5 M ureia e 5% DL-ditiotreitol, deixando-se reagir a 50 °C durante 48 h, sobre agitação constante. Seguidamente, a mistura reaccional foi centrifugada (8000 *g*, 15 min), e o “pellet” resultante lavado com água Milli-Q (2 x 15 mL) e seco sob corrente de azoto.

A eficácia do método foi testada através da aplicação do método de Bradford para a detecção de proteínas no sobrenadante [31].

➤ Digestão Enzimática

Para a realização da digestão enzimática das melaninas extraídas da tinta de choco e de polvo, suspendeu-se a melanina (3 g) e o DL-ditiotreitol (0,21 g) em 32 mL de uma solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5, tendo-se deixado sobre agitação constante durante 3 horas. A presença do agente redutor facilita a quebra das ligações S-S que possam estar envolvidas na composição das cadeias polipeptídicas agregadas à melanina, obtendo-se uma estrutura oxidada em forma de anel.

Seguidamente, adicionou-se  $8,0 \times 10^{-4}$  g de Proteinase K e 0,11 g de DL-ditiotreitol, tendo-se deixado reagir a mistura por mais 4 horas. O precipitado foi recuperado por centrifugação (8000 *g*, 15 min) e lavado com uma mistura de água : metanol 1:1 (v/v). Por fim, uma segunda lavagem utilizando-se água Milli-Q (2 x 15 mL) foi realizada, e o precipitado resultante seco sob corrente de azoto.

A presença de aminoácidos no sobrenadante foi confirmada recorrendo ao método de Bradford.

➤ Digestão ácida

O processo de digestão ácida envolveu a suspensão de melanina (3 g) numa solução 1M HF/4M NH<sub>4</sub>F, pH 5. Após 4 horas de agitação à temperatura ambiente, a mistura resultante foi centrifugada (8000 *g*, 15 min) e o “pellet” lavado com água (2 x 15 mL) até se atingir pH neutro. O precipitado resultante foi suspenso numa mistura CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (2:1 v/v), a qual se manteve sobre agitação ao longo de 24 horas. Esta

segunda lavagem teve como principal objectivo retirar possíveis fragmentos biológicos agregados às melaninas obtidas da tinta de choco e do polvo. A mistura resultante desta última lavagem foi centrifugada (8000 g, 15 min) e o “pellet” lavado com água Milli-Q (2 x 15 mL) e seco sob corrente de azoto. Tal como nos processos de digestão descritos anteriormente, o sobrenadante foi igualmente testado para a presença de proteínas aplicando-se o método de Bradford.

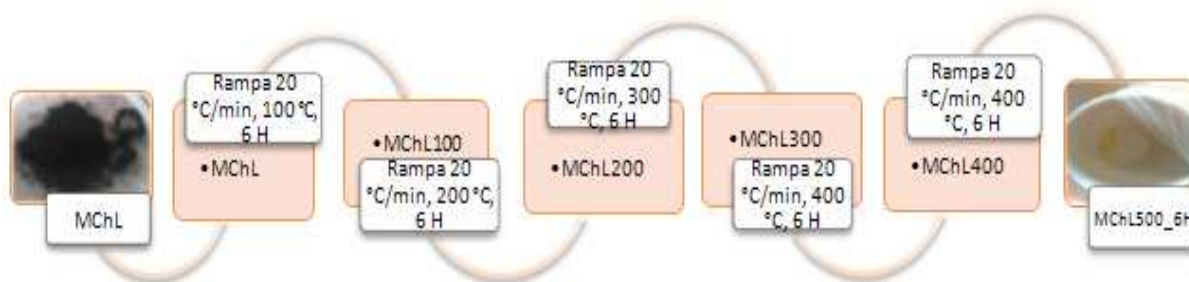
### 2.2.2 Tratamento térmico de melaninas

As melaninas isoladas das tintas de choco (MChL) e de polvo (MPL) foram submetidas a diferentes condições de aquecimento, tendo-se registado a variação de massa no final de cada tratamento térmico (**Tabelas 8 e 9**). Todo o tratamento térmico foi executado numa mufla e em atmosfera de ar. Entre cada ensaio, as amostras foram armazenadas em exsicador de modo a evitar a sua re-hidratação.

#### ➤ Aquecimento 1

Este primeiro tratamento térmico consistiu no aquecimento da melanina obtida da tinta de choco a diversas temperaturas, por um período de tempo idêntico e aplicando uma rampa de aquecimento semelhante. Primeiramente, a amostra MChL (de coloração preta) foi aquecida aplicando uma rampa de 20 °C/min até à temperatura de 100 °C, seguida de um patamar a esta temperatura de 6 horas. Depois de arrefecida (através do decréscimo da temperatura da mufla até 25 °C), a amostra resultante (MChL100) foi pesada e armazenada em exsicador até ao próximo tratamento térmico, não se tendo verificado qualquer variação de massa durante este período. A amostra MChL100 foi seguidamente aquecida até 200 °C, tendo-se aplicado novamente uma rampa de temperatura de 20 °C/min e um patamar de 6 horas, de onde resultou a amostra MChL200. As condições de armazenamento desta amostra foram idênticas às utilizadas para a amostra MChL100.

Este tratamento térmico sucessivo foi repetido até à temperatura de 500 °C, tendo-se obtido as amostras MChL300, MChL400 e MChL500\_6H, esta última caracterizada por uma coloração branca. Tal como foi acima referido, a variação de massa de cada amostra após cada tratamento térmico foi registada.



### ➤ Aquecimento 2

Este tratamento térmico consistiu num único aquecimento (contínuo) das amostras MPL e MChL (coloração preta) aplicando várias rampas de temperatura, tendo-se obtido no final as amostras MChB e MPLB (coloração esbranquiçada). Resumidamente, a amostra foi inicialmente aquecida até 300 °C aplicando-se uma rampa de temperatura de 3 °C/min. Após um patamar de 2 horas à temperatura anterior, aqueceu-se a amostra a uma velocidade de 1 °C/min até 400 °C, temperatura à qual permaneceu durante 2 horas. Um posterior aquecimento até à temperatura limite de 500 °C, aplicando uma idêntica rampa de temperatura e um patamar de 4 horas, permitiu a obtenção de uma amostra com uma coloração esbranquiçada.



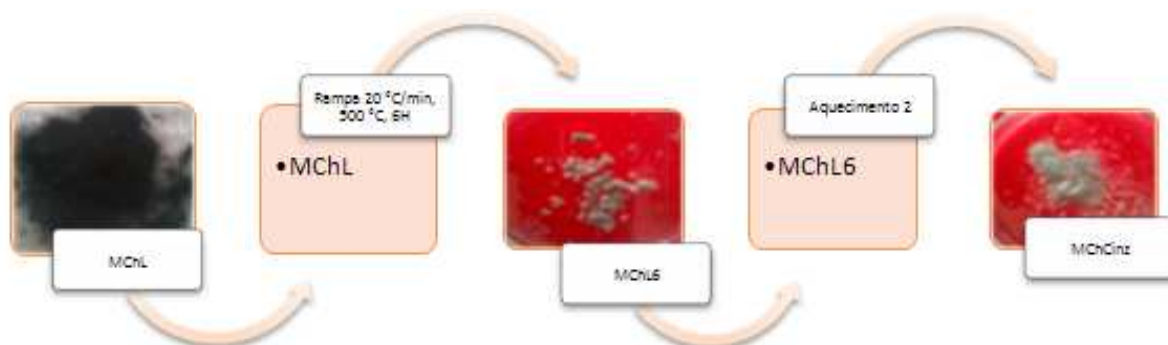
### ➤ Aquecimento 3

Este tratamento térmico teve como objectivo avaliar possíveis alterações que ocorreriam na melanina quando exposta por longos períodos de tempo à temperatura de 500 °C. Deste modo, a amostra MChL foi inicialmente aquecida a uma velocidade de 20 °C/min até à temperatura de 500 °C, onde permaneceu durante um período de 24 horas. Após o arrefecimento e pesagem da amostra resultante (MChL500\_24), repetiu-se o mesmo tratamento térmico por mais duas vezes, tendo-se obtido as amostras MChL500\_48 e MChL500\_72. As amostras provenientes deste tratamento apresentavam uma coloração branca acinzentada, a qual se tornava mais clara com o aumento do tempo de exposição da amostra à temperatura de 500 °C.



➤ Aquecimento 4

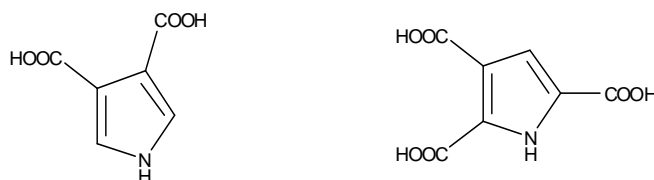
Este tratamento térmico consistiu na execução de dois aquecimentos distintos, tendo-se obtido uma amostra intermédia MChL6, resultante de um primeiro tratamento térmico, e uma amostra final MChCinz, derivada do tratamento térmico da amostra intermédia obtida. Assim, a amostra MChL foi inicialmente aquecida a uma velocidade de 20 °C/min até 500 °C, temperatura à qual permaneceu durante 6 horas. Depois de arrefecida, a amostra resultante (MChL6) foi pesada e submetida a um novo tratamento térmico em condições idênticas às utilizadas no Aquecimento 2, de onde resultou a amostra MChCinz.



### 3. Caracterização estrutural

#### 3.1 Introdução

Do ponto de vista estrutural, as melaninas podem ser definidas como pigmentos hidrofóbicos de grande massa molecular, formados via polimerização oxidativa de compostos de natureza fenólica e/ou indólica [15]. Estes compostos constituem as unidades monoméricas das eumelaninas, tendo sido devidamente identificados através de ensaios de degradação oxidativa ( $H_2O_2$  em meio alcalino) de melanina isolada da tinta de choco. Os produtos resultantes destes ensaios foram o ácido pirrolo-2,3,5-tricarboxílico (PTCA) e o ácido pirrolo-2,3-carboxílico (PDCA) [32].



**Figura 8** - Estrutura dos ácidos pirrolo-2,3,5-tricarboxílico (direita) e pirrolo-2,3-carboxílico (esquerda)

Enquanto o primeiro é considerado um produto de degradação das unidades de DHICA, o segundo deriva exclusivamente das unidades de DHI, confirmando-se assim a presença destes dois monómeros na estrutura da melanina. Em virtude da natureza de cada um, a determinação quantitativa dos compostos representados na Figura 8 permite concluir sobre a relação entre unidades DHI e DHICA presentes na estrutura do pigmento.

Apesar de se encontrar bem estabelecida perante a comunidade científica a estrutura dos monómeros que compõem a melanina, a estrutura global do pigmento permanece ainda alvo de grande especulação [33]. Porém, tal como a sua estrutura, também o mecanismo de polimerização deste pigmento tem levantado bastantes dúvidas. Neste campo vários estudos teóricos, envolvendo modelos de dímeros e tetrâmeros dos monómeros que compõem a melanina, têm sido realizados. Estes estudos revelam que a formação deste pigmento se baseia num mecanismo de polimerização oxidativa, onde várias unidades derivadas da oxidação da molécula de DHI têm sido consideradas como fazendo parte da estrutura da melanina, como é o caso da indolequinona (IQ), e semiquinona (SQ) (Figura 9).

## Melaninas de origem marinha: Caracterização Química e Termofísica

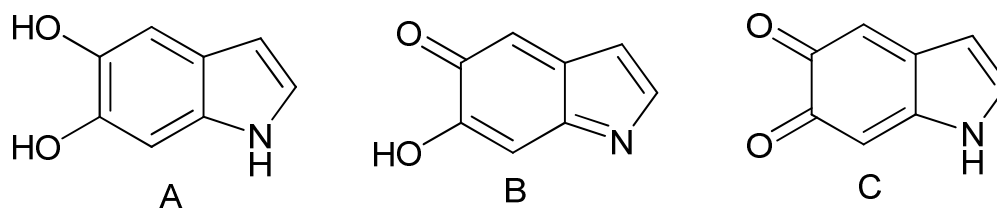


Figura 9 -Representação da molécula de DHI (A) e as suas formas oxidadas SQ (B) e IQ (C)

As conclusões retiradas dos diversos estudos já realizados sugerem que a polimerização pelas posições 2 e 4 das moléculas de DHI origina oligómeros energeticamente mais estáveis, embora a ocorrência de polimerização nas posições 3, 4 e 7 seja também viável (Figura 10A) [26]. Por sua vez, no que se refere ao monômero DHICA, o modo de polimerização mais provável envolve as posições 4 e 7 do anel benzênico (Figura 10B) [34].

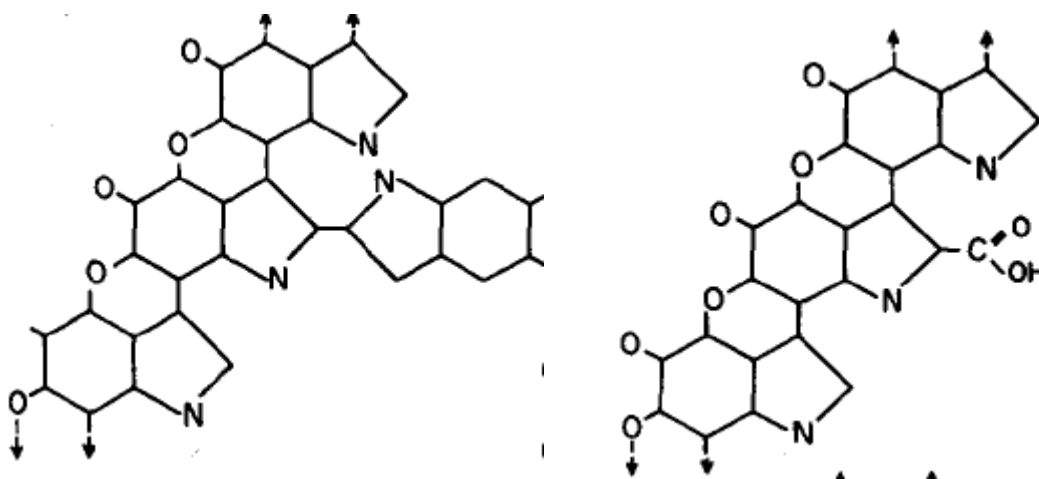


Figura 10 -Modelos de polimerização propostos para as eumelaninas<sup>[66]</sup>

A obtenção de informação mais aprofundada acerca da estrutura e mecanismo de polimerização da melanina poderá ser alcançada através da aplicação de técnicas de estado sólido, entre elas a espectroscopia Infra-Vermelho (IV), difracção de raios-X (DRX), análise elementar (EDS) e espectrometria de massa (MALDI). Estas técnicas foram aplicadas às amostras de melanina nativas e às resultantes dos diferentes processos digestão e tratamento térmico, tendo-se utilizado como referência a melanina sintética proveniente da Sigma® (ref.: M8631). A importância desta análise estrutural reside no seu possível contributo para a fundamentação das propriedades macroscópicas observadas nestas macromoléculas biológicas.



## 3.2 Espectroscopia de Infravermelho

### 3.2.1 Descrição e modo de execução

A espectroscopia de Infravermelho (IV) é definida como uma técnica analítica de grande rapidez e precisão, que se baseia na absorção da radiação IV por parte das moléculas a determinadas frequências de ressonância, permitindo a identificação da amostra em estudo [35]. Durante a análise, apenas a radiação IV cuja energia corresponde aos modos normais de vibração das moléculas presentes é absorvida, resultando no aparecimento de bandas em zonas específicas do espectro. Deste modo, o intervalo de frequências em que surge a banda é específico de cada modo normal de vibração da molécula, o que permite retirar informação quanto ao grupo funcional e o tipo de ligação presente [36].

Neste tipo de espectroscopia, o espectro IV poderá ser traçado em função da radiação transmitida, absorvida ou reflectida. Neste caso, o espectro de IV foi traçado recorrendo à técnica de reflectância difusa. Esta técnica revela-se ideal na análise de pós finos e de elevada rugosidade, uma vez que se baseia na medição da radiação reflectida em diversos ângulos, motivada pela irregularidade da superfície do material.

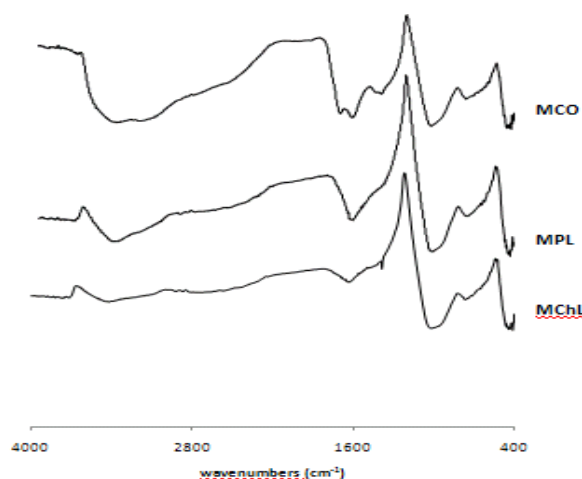
**Materiais:** Na análise das melaninas por espectroscopia IV, utilizou-se um espectrofotómetro Thermo Nicolet 6800 com um acessório de reflectância difusa Nexus®.

**Métodos:** Na preparação das amostras para análise IV diluíram-se as melaninas em brometo de potássio (1:100 m/m), tendo-se misturado cuidadosamente até se obter uma coloração uniforme. A análise foi realizada no intervalo de números de onda 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.2 Resultados

Na Figura 11 apresentam-se os espectros obtidos das melaninas extraídas dos dois organismos marinhos e da melanina utilizada como referência. Os espectros das melaninas isoladas das tintas de choco e do polvo revelaram-se bastante semelhantes ao espectro obtido para a melanina sintética, apesar das diferenças registadas na zona

dos 1700-1400  $\text{cm}^{-1}$ , característica de modos normais de vibração da ligação entre carbono e oxigénio.



**Figura 11** - Espectros IV melaninas extraídas do choco (MChL), polvo (MPL) e comercial (MCO)

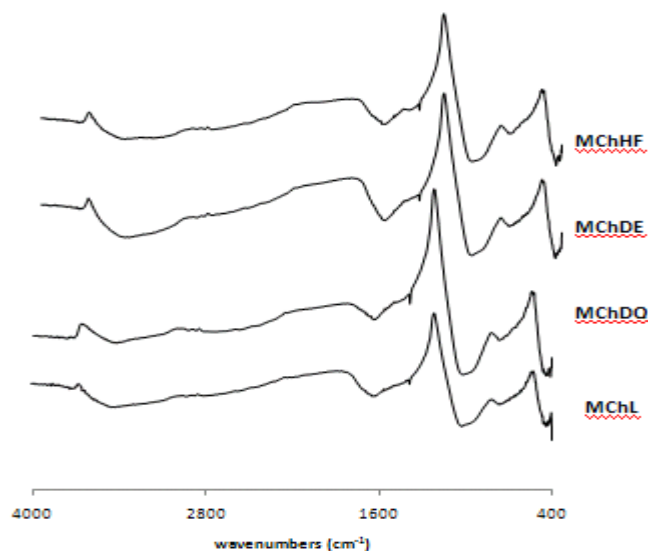
Na Tabela 1 encontram-se as principais bandas registadas nestes espectros e a sua possível identificação.

**Tabela 1** - Frequências e modos normais de vibração observados nas melaninas MChL, MPL e MCO

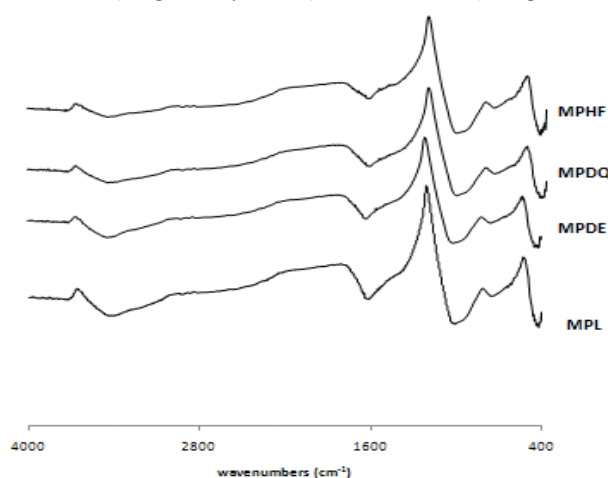
Amostra	Números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Modo normal de vibração/tipo de ligação
MChL, MPL, MCO	3450	Elongação O-H fenóis e elongação N-H em aminas secundárias
MChL, MPL, MCO	1620	Elongação assimétrica $\text{COO}^-$ , elongação C=C em aromáticos
MCO	1714	Elongação C=O em COOH grupos
MChL, MPL, MCO	1400	Elongação C-O-H em fenóis, elongação C-O ou elongação assimétrica em grupos COOH
MChL, MPL, MCO	1030	Elongação C-N em anéis pirrólicos
MChL, MPL, MCO	770-735	Bending C-H para fora do plano em anéis aromáticos substituídos na posição orto

As amostras resultantes da aplicação dos vários métodos de digestão foram também analisadas por espectroscopia IV, tendo-se obtido os espectros representados nas Figuras 12 e 13.

## Melaninas de origem marinha: Caracterização Química e Termofísica



**Figura 12** - Espectros IV melanina extraída do choco liofilizada não purificada (MChL), liofilizadas e submetidas a digestão ácida (MChHF e MPHf), digestão química (MChDQ e MPDQ) e digestão enzimática (MChDE e MPDE)



**Figura 13** - Espectros IV melanina extraída do polvo liofilizada não purificada (MPL), liofilizada e submetida a digestão ácida (MPHF), digestão química (MPDQ) e digestão enzimática (MPDE)

A semelhança verificada entre os espectros IV obtidos permite concluir que os processos de purificação utilizados não produziram alterações profundas ao nível da estrutura das melaninas.

Os espectros provenientes da análise por espectroscopia IV das amostras resultantes do tratamento térmico (Aquecimento 1) da melanina isolada da tinta de choco e submetida a secagem por liofilização encontram-se representados na Figura 14.

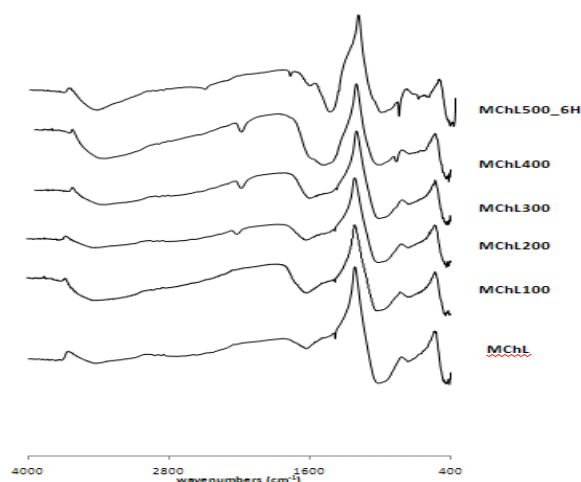


Figura 14 - Espectros IV da amostra MChL tratada termicamente (Aquecimento 1) até 500 °C

Estes espectros demonstram a ocorrência de alterações a nível estrutural, as quais se acentuam com o aumento de temperatura. A melanina revela uma considerável estabilidade até ser submetida a um aquecimento de 6 horas a 200 °C, altura em que surge uma pequena banda adicional no espectro IV a 2210 cm<sup>-1</sup>. Ainda assim, a melanina permanece relativamente estável até ao patamar de temperatura de 400 °C, onde se começam a observar acentuadas alterações no espectro IV. Além de um contínuo aumento de intensidade da banda localizada a 2210 cm<sup>-1</sup>, assiste-se também a um deslocamento da banda a 1625 cm<sup>-1</sup> (presente nas melaninas tratadas a temperaturas < 400 °C) para 1488 cm<sup>-1</sup>, bem como à formação de uma pequena banda a 877 cm<sup>-1</sup>. Por sua vez, quando a temperatura é aumentada em mais 100 °C, verifica-se uma maior definição da banda a 1488 cm<sup>-1</sup> (torna-se mais estreita e aumenta de intensidade), observando-se igualmente a formação de um ombro a 1625 cm<sup>-1</sup> e um decréscimo de intensidade da banda localizada a 2210 cm<sup>-1</sup>.

Por sua vez, numa gama de frequências mais elevada (3400-3300 cm<sup>-1</sup>), destaca-se um estreitamento da banda presente neste intervalo com o aumento da temperatura, o que pode indicar um decréscimo de grupos O-H e N-H na macromolécula.

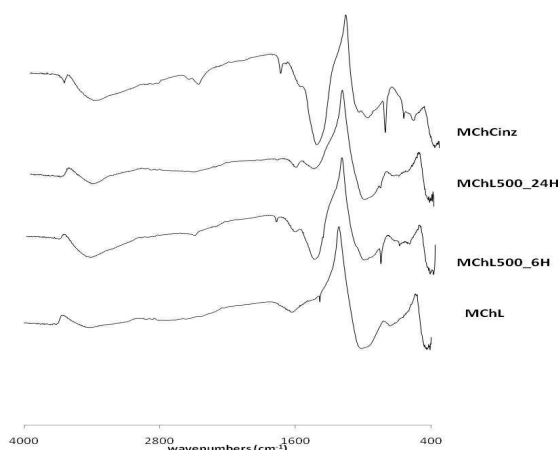
## Melaninas de origem marinha: Caracterização Química e Termofísica

**Tabela 2** - Frequências e modos normais de vibração observados na melanina do choco tratada termicamente

Amostra	Números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
MChL100, MChL200, MChL300, MChL400, MChL500_6H	3450	Elongação O-H em fenóis e elongação N-H em aminas secundárias
MChL200, MChL300, MChL400	2210 $\text{cm}^{-1}$	Elongação ligação C-N do ião cianeto em aromáticos
MChL100, MChL200, MChL300, MChL400, MChL500_6H	1620	Elongação assimétrica $\text{COO}^-$ , elongação C=C em aromáticos
MChL400, MChL500_6H	1468	Elongação C=O em iões carbonato
MChL100, MChL200, MChL300, MChL400, MChL500_6H	1400	Elongação C-O-H em fenóis, elongação C-O ou elongação assimétrica em grupos COOH
MChL100, MChL200, MChL300, MChL400, MChL500_6H	1030	Elongação C-N em anéis pirrólicos
MChL400, MChL500_6H	877	“Bending” C=O para fora do plano em iões carbonato
MChL100, MChL200, MChL300, MChL400, MChL500_6H	770-735	“Bending” C-H para fora do plano em anéis aromáticos orto-substituídos

No entanto, apesar das alterações provocadas pelo aumento de temperatura, a comparação do espectro IV das amostras de melanina MChL e MChL500\_6H permite concluir que se mantiveram alguns dos picos característicos da amostra inicial, factor que poderá ser indicativo da resistência do biopolímero a temperaturas elevadas.

Por sua vez, quando se procedeu à alteração das condições de aquecimento, mantendo um patamar limite de temperatura idêntico, observou-se igualmente alguma variabilidade estrutural nas melaninas resultantes (Figura 15). A melanina MChL500\_24H revelou uma maior semelhança em termos estruturais com a amostra de partida (MChL), ao contrário das amostras MChCinz e MChL500\_6H.



**Figura 15** – Espectros IV de amostras melanina do choco resultantes de diferentes condições de aquecimento de MChL

Estas observações demonstram que as transformações que ocorrem na melanina encontram-se dependentes das condições de aquecimento aplicadas.

### 3.2 Microscopia electrónica de varrimento com microanálise raios-X - Análise Elementar

#### 3.2.1 Descrição e modo de execução

A microscopia electrónica de varrimento com microanálise raios-X possibilita a análise da superfície de um material quanto à sua morfologia (SEM) e composição elementar (EDS). Nesta técnica, a amostra é bombardeada com um feixe de electrões de elevada intensidade, cuja reflexão por parte das camadas electrónicas da amostra origina uma imagem da sua superfície. Deste modo, o material a analisar deverá possuir características condutoras, caso contrário, este deverá ser coberto com uma película de ouro, evitando a ocorrência de acumulação de carga à superfície [37].

Por outro lado, a velocidade e energia cinética com que estes electrões embatem na amostra poderão ser suficientes para retirar electrões das camadas energéticas mais internas dos elementos presentes, promovendo a emissão de radiação X. A radiação emitida é característica do tipo de elemento presente na amostra, fornecendo assim informação acerca da sua composição elementar.

**Materiais:** As amostras foram pulverizadas com ouro utilizando um Polaron E5100. As imagens SEM foram adquiridas num FEG-SEM da Jeol, modelo JSM 7001-F, a uma tensão de aceleração de 15 KeV. A análise elementar foi realizada com recurso a um detector de elementos leves (Oxford).

**Métodos:** A preparação das melaninas analisadas por SEM-EDS consistiu na deposição das amostras (cerca de 1 mg) num suporte de alumínio (revestido por uma fita autocolante de carbono), seguindo-se a sua cobertura com um filme de ouro.

### 3.2.2 Resultados

Procedeu-se à análise elementar das melaninas modificadas, tendo como base de comparação as amostras de partida (MChL e MPL). A composição elementar destas duas últimas amostras foi ainda comparada com a referente à melanina comercial (MCO), considerando que os diferentes processos de síntese envolvidos.

**Tabela 3** - Análise elementar das melaninas do choco e do polvo purificadas, não purificadas e melanina comercial

	Composição elementar (%)										
Amostra	C	O	Ca	Mg	Na	Cl	Fe	S	F	Si	Pt
MCO	72,63	25,73	----	----	----	----	0,38	----	----	----	----
MChL	64,15	29,73	0,93	1,44	2,16	0,57	---	----	----	----	----
MChDQ	71,77	22,60	0,87	1,48	0,28	----	----	2,19	----	----	----
MChDE	70,95	23,54	0,62	1,21	1,64	----	----	1,29	----	----	----
MChHF	65,27	14,60	1,51	2,72	1,56	----	----	----	12,81	0,37	----
MPL	85,91	12,53	0,31	0,24	----	----	----	----	----	----	----
MPDQ	Resultados não fornecidos										
MPDE	71,67	23,85	0,97	0,75	0,83	----	----	0,98	----	----	0,13
MPHF	75,19	15,77	1,48	0,63	----	----	----	----	5,61	----	----

Os resultados obtidos demonstram uma composição elementar distinta entre as melaninas de origem natural e sintética. Esta discrepância manifesta-se essencialmente ao nível da composição em metais, verificando-se a presença de metais pertencentes aos grupos 1 e 2 da tabela periódica nas amostras MChL e MPL. Estes metais encontram-se ausentes na amostra MCO, cuja composição revela apenas vestígios de Fe. Entre as duas melaninas de origem natural, a que possui maior quantidade de metais é a proveniente da tinta do choco.

No que se refere às melaninas purificadas, não se observam acentuadas diferenças nas quantidades de carbono e oxigénio, o que poderá ser indicativo de que a estrutura base das melaninas não sofreu alterações significativas mediante os

## Melaninas de origem marinha: Caracterização Química e Termofísica

processos de purificação aplicados. No entanto, o tipo de digestão utilizado poderá influenciar a quantidade de metais presentes na amostra final. Observando a Tabela 3, é possível constatar um maior decréscimo dos níveis de sódio quando se recorre ao método de digestão química para purificação da melanina isolada da tinta de choco (MChL e MChDQ). Por outro lado, a quantidade de metais detectados nas amostras de melanina tratadas com HF (MChHF e MPHF) aumenta bastante, particularmente no que se refere aos metais do grupo II (Ca e Mg). Nestas amostras destaca-se também a presença de uma grande quantidade de flúor, resultado de uma ineficaz lavagem após purificação.

Além das melaninas purificadas, também as melaninas tratadas termicamente foram analisadas quanto à sua composição elementar (Tabela 4).

**Tabela 4** - Análise elementar das melaninas do choco e do polvo sujeitas a tratamento térmico

Amostra	Composição elementar (%)								
	C	O	Ca	Mg	Na	K	Cl	Fe	S
MChL	64,15	29,73	0,93	1,44	2,16	0,57	----	----	----
MChL500_6H	18,94	55,66	6,55	10,31	6,47	0,23	----	----	1,10
MChL500_24	26,01	43,37	5,21	16,25	4,23	0,32	3,26	----	----
MChL500_48	27,02	43,19	3,39	5,36	11,98	0,29	7,32	----	0,97
MChL500_72	38,98	29,12	5,09	8,87	7,71	0,42	8,90	----	----
MChCinz	Resultados não fornecidos								
MPL	85,91	12,33	0,31	0,24	----	----	----	----	----
MPLB	19,07	49,95	7,24	16,06	2,62	1,22	----	----	2,44

Na análise destas amostras, torna-se importante destacar a ocorrência de uma elevada perda em carbono após aquecimento a 500 °C. Esta redução acentuada na quantidade deste elemento verifica-se tanto na melanina extraída da tinta de choco, como na proveniente da tinta de polvo. Como exemplo podem-se considerar as amostras MChL500\_6H e MPLB, as quais evidenciam uma perda de 71 e 78% de carbono relativamente ao material de partida (MChL e MPL). Além da perda em carbono, torna-se também importante destacar um ganho em oxigénio de cerca de 47 e 75%, respectivamente, bem como um aumento significativo do conteúdo em metais.



Este aumento revela-se mais expressivo ao nível dos metais pertencentes ao grupo dos alcalino-terrosos, tendo-se verificado um aumento de cerca de 11 (MChL500\_6H) e 7 (MPLB) vezes na quantidade de magnésio relativamente às amostras de partida, enquanto o cálcio sofreu um aumento de 7 vezes e 6 vezes, respectivamente. Curioso é também o facto de não se terem registado alterações significativas nas quantidades de carbono e oxigénio consoante os diferentes períodos de tempo a que as amostras permaneceram a 500 °C.

### **3.3 Espectrometria de massa com ionização a laser assistida por matriz**

#### **3.3.1 Descrição e modo de execução**

A espectrometria de massa é definida como um método analítico que se baseia na produção de iões gasosos resultantes do bombardeamento da amostra com um feixe energético, na presença de campos eléctricos e magnéticos e em alto vácuo [35]. Estes iões são acelerados ao longo de um analisador, atingindo o detector a uma velocidade dependente da sua massa e carga, o que torna possível a sua identificação através da razão massa/carga ( $m/z$ ). A técnica de ionização utilizada é responsável pelo grau de fragmentação das espécies iónicas produzidas, sendo que uma menor fragmentação facilita a determinação da massa molecular do composto.

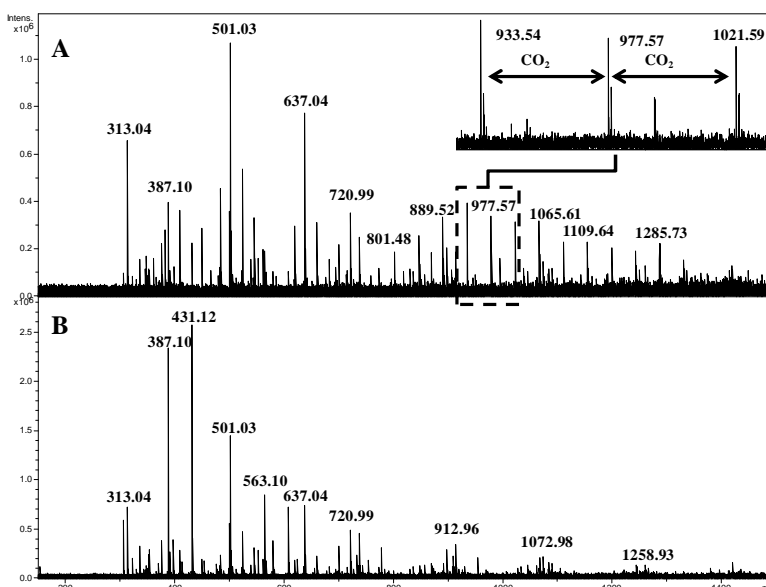
**Materiais:** Os ensaios MALDI foram realizados num espectrómetro de massa Bruker Daltonics Apex Ultra FTICR, equipado com um magneto blindado supercondutor de 7.0 Tesla. Os iões foram gerados numa fonte externa MTP Apollo II Scout da Bruker Daltonics, equipada com laser N<sub>2</sub> ( $\lambda=337$  nm), em modo positivo. A energia do laser foi mantida a 80% do seu valor máximo (80-100  $\mu$ J na posição alvo) e a duração do pulso de laser foi de 4 ns. O espectro obtido resultou de uma média de 32 espectros com 20 disparos laser por espectro. Como suporte da amostra, foi utilizado um prato em aço polido, da Bruker Daltonics. A matriz utilizada foi uma solução saturada 10 mg/mL de ácido 2,5-dihidroxibenzóico em água Milli-Q (purificada utilizando um sistema Millipore Billerica, Ma, EUA).

**Métodos:** Para preparação da amostra, procedeu-se à mistura de volumes iguais de suspensões da matriz e da amostra, tendo-se aplicado uma alíquota da solução

resultante no suporte de análise MALDI. As melaninas analisadas (MChDE e MCO) foram sujeitas a uma hidrólise prévia de 48 horas em HCl 6 M. Este procedimento de hidrólise foi repetido por duas vezes durante o processo de preparação das amostras.

### 3.3.2 Resultados

A espectrometria de massa pode fornecer dados importantes na análise do mecanismo de polimerização e arranjo estrutural das melaninas. Deste modo, realizou-se um estudo comparativo das amostras MChDE e MCO, recorrendo à técnica de espectrometria de massa com ionização por laser assistida por matriz (MALDI).



**Figura 16** -Espectros de massa MALDI das amostras MChDE (A) e MCO (B) (o retângulo no lado superior direito do espectro A mostra uma ampliação do intervalo de  $m/z$  930-1030)

Os espectros de massa obtidos demonstram a presença de um padrão semelhante para ambas as amostras de melanina até sensivelmente  $m/z=800$  Da. A valores de  $m/z$  superiores, os espectros A e B representados na figura 16 apresentam acentuadas diferenças, destacando-se no primeiro uma diferença constante de 44,02 Da entre os picos, a qual poderá ser atribuída à molécula de  $\text{CO}_2$ . No entanto, nesta fracção do espectro, são ainda visíveis, embora com menor intensidade, picos comuns aos dois espectros, nomeadamente a  $m/z$  912,96, 1072,98 e 1258,93.

Por sua vez, para valores de  $m/z < 800$  Da (Figura 16), é curioso verificar a presença de picos com considerável abundância a razões  $m/z$  313, 501, 637, 801, embora a intensidade deste último seja menor. Estes picos revelam uma diferença de massas de 188 Da, 136 Da e 164 Da entre eles, e a sua presença é indicativa de alguma

semelhança entre as estruturas oligoméricas de menor dimensão formadas durante o processo de síntese das melaninas.

**Tabela 5** - Comparação entre os picos registados na análise MALDI da amostra MChDE e valores encontrados na bibliografia, provenientes da análise MALDI de melaninas extraídas da tinta de choco

<b>Amostra</b>	<b>Picos mais intensos (m/z)</b>						
"Pellet" resultante da centrifugação de " <i>Sepia melanin</i> " a 13000 rpm, com digestão enzimática e hidrólise ácida (MChDE)	313,04	501,10	637,03	720,04	801,48	1285,73	-----
"Pellet" resultante da centrifugação de " <i>Sepia melanin</i> " a 5000 rpm [38]	526	703	910	1093	1272	-----	-----
"Pellet" resultante da centrifugação de " <i>Sepia melanin</i> " a 16 000 rpm [38]	313	335	349	450	526	552	685
" <i>Sepia melanin</i> " hidrolisada por duas vezes com 6 M HCl [39]	208,6	363,5	379,4	415,8	552,3	-----	-----

A Tabela 5 demonstra uma grande discrepância nos picos mais intensos registados na análise MALDI da amostra MChDE e os retirados das referências bibliográficas [38] e [39], provavelmente resultante dos diferentes métodos de preparação da amostra.

### 3.4 Difracção de Raios-X

#### 3.4.1 Descrição e modo de execução

A difracção de raios-X é uma técnica vulgarmente utilizada na determinação das posições atómicas na estrutura molecular, fornecendo igualmente informação sobre a cristalinidade e estados de oxidação do composto.

A técnica baseia-se na interacção de um feixe de radiação X com as nuvens electrónicas dos átomos que compõem a amostra. A radiação é difractada de acordo com o arranjo dos átomos na estrutura do material, pelo que a interferência construtiva das ondas difractadas permite o cálculo da distância interplanar com base na lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

onde  $n$  é o número de camadas, possuindo convencionalmente o valor da unidade,  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação,  $d$  o espaçamento entre os planos e  $\theta$  o ângulo

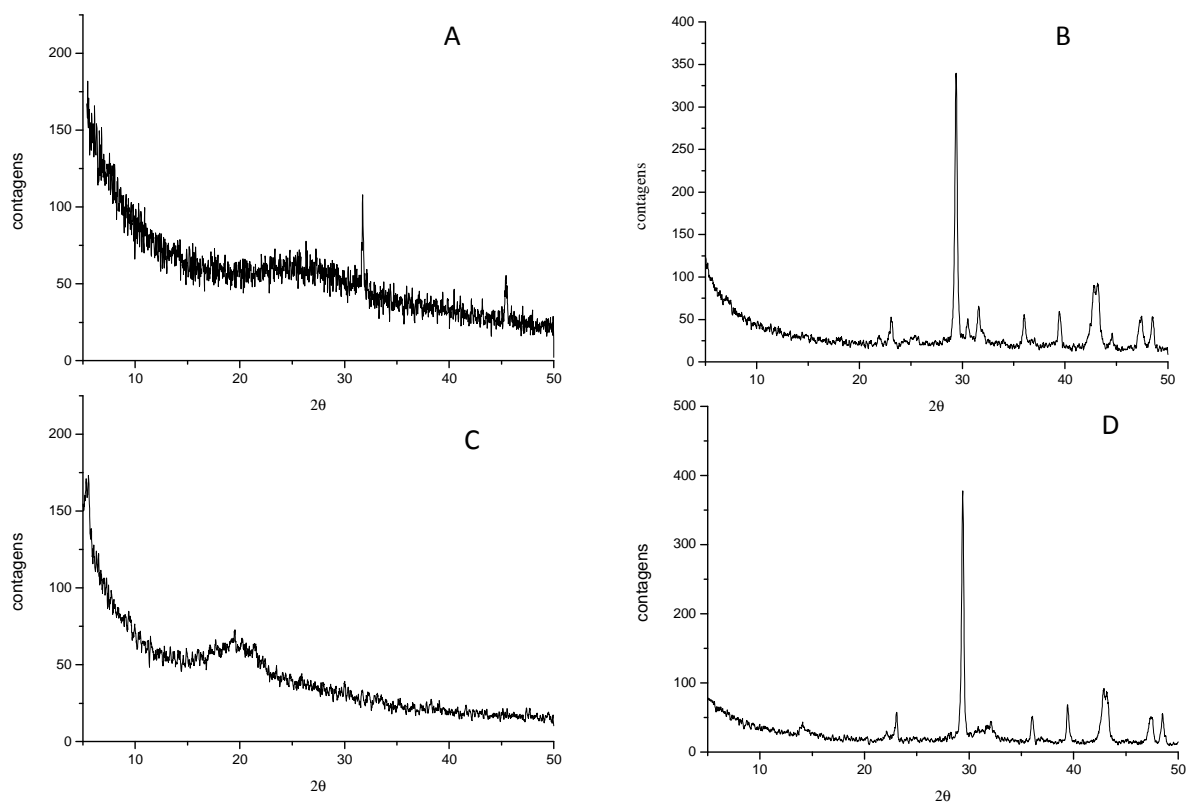
resultante da interacção da radiação incidente com os planos cristalográficos. Esta distância  $d$  permite definir o parâmetro de malha da célula e consequentemente, o grau de cristalinidade da amostra.

**Materiais:** A preparação das amostras para análise por difracção de raios-X consistiu na suspensão de uma pequena quantidade de amostra (cerca de 2 mg) em acetona. Esta mistura foi aplicada num suporte de silício amorfo, deixando-se o excesso de solvente evaporar ao ar.

**Métodos:** A amostra foi analisada num difractómetro Philips, modelo PW1710, equipado com uma ampola de Cu, cujo comprimento de onda da radiação  $K\alpha$  emitida é de  $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ .

### 3.4.2 Resultados

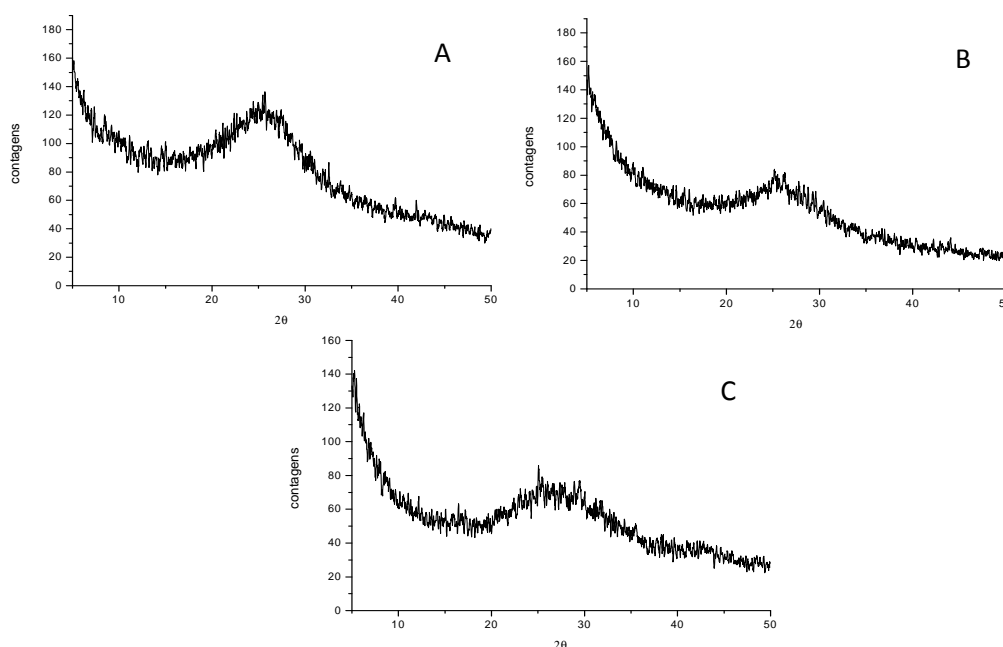
Tendo em conta que uma reacção térmica pode ser responsável pela alteração do arranjo atómico de alguns materiais, procedeu-se à análise por difracção de raios-X dos compostos resultantes do tratamento térmico das amostras MChL e MPL.



**Figura 17** -Difractogramas das amostras de melanina de partida MChL (A) e MPL (C) e das resultantes do tratamento térmico correspondente ao Aquecimento 2, MChB (B) e MPLB (D), descrito na secção 2.2.2

A análise dos difractogramas representados na figura 17 permite concluir que o tratamento térmico das melaninas de origem natural favoreceu a obtenção de um composto com maior organização a nível atômico, transitando-se de uma estrutura completamente amorfa para uma estrutura reveladora de alguma cristalinidade. Nos difractogramas das amostras MChB e MPLB denota-se a presença de, pelo menos, duas fases, podendo uma delas derivar da presença de carbonato de cálcio na forma de calcite (Anexo I, Tabela A) [40].

Para uma melhor compreensão do fenómeno de transição verificado, seguiu-se por DRX o tratamento térmico da amostra MChL (Aquecimento 1) ao longo dos vários patamares de temperatura (Figura 18).

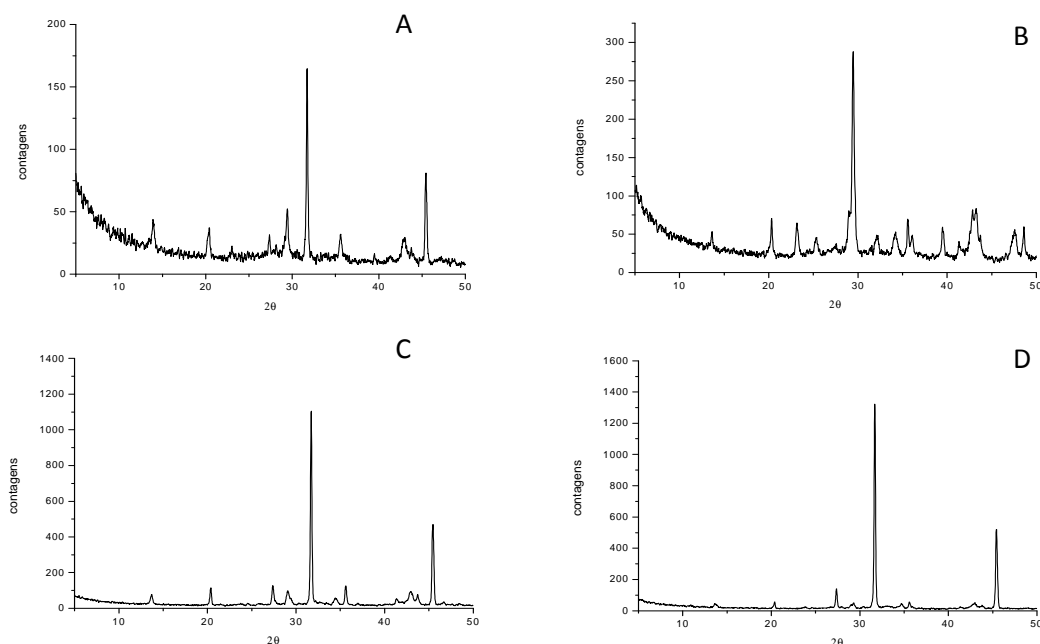


**Figura 18** - Difractogramas amostras MChL200 (A), MChL300 (B), MChL400 (C)

Os difractogramas anteriores demonstram a presença de uma banda bastante larga no intervalo  $2\theta = 20^\circ$  a  $2\theta = 30^\circ$ , característica de uma amostra não cristalina. A estabilidade da melanina a elevadas temperaturas é evidenciada no difractograma C da Figura 17, onde esta mantém a sua forma amorfa mesmo após o tratamento térmico a  $400^\circ\text{C}$ .

De modo a verificar a influência das condições de aquecimento na cristalização do composto final, examinaram-se quatro amostras (MChL6, MChL500\_6H,

MCh500\_24 e MCh500\_72) provenientes de diferentes tratamentos térmicos da amostra MChL.



**Figura 19** - Difractogramas das amostras MChL6 (A), MChL6H\_500 (B), MCh500\_24 (C) e MCh500\_72 (D)

A análise dos difractogramas da figura 19 permite identificar a ocorrência de, pelo menos, duas fases. A presença de picos característicos de  $\text{CaCO}_3$  é significativamente relevante no difractograma correspondente à amostra MChL6H\_500 (Anexo I, Tabela B). Por outro lado, verifica-se também a existência de outros picos cuja origem não se conseguiu desvendar. No entanto, é curioso observar que alguns destes picos surgem a valores de  $d$  comuns em todas as amostras analisadas (Anexo I, Tabelas A e B), independentemente da sua origem ou das condições de aquecimento utilizadas.

A diferente coloração (cinzento escuro) apresentada pela amostra MChL6, conjugada com o difractograma correspondente (Figura 19A) parece ser indicativo que o aquecimento não foi suficiente para promover uma transição completa. Assim, a esta amostra foi aplicado um aquecimento adicional com uma rampa de  $3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  até  $300\text{ }^\circ\text{C}$ , permanecendo 2 horas a esta temperatura, seguindo-se uma rampa  $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  até  $400\text{ }^\circ\text{C}$ , com um patamar de 2 horas e finalmente, uma rampa equivalente até  $500\text{ }^\circ\text{C}$ , onde a amostra se manteve durante 4 horas (Aquecimento 4, subcapítulo 2.2.2).

Deste tratamento térmico obteve-se a amostra MChCinz, cujo difractograma se encontra representado na Figura 20.

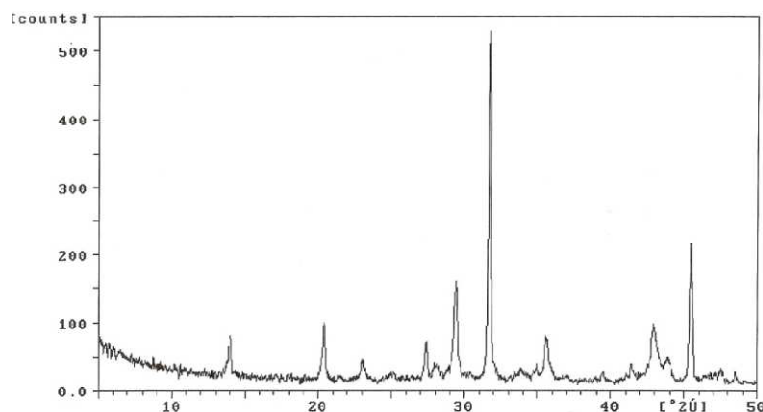


Figura 20 - Difractograma da amostra MChCinz

### 3.5 Discussão de Resultados

Os resultados apresentados, derivados das análises IV e EDS das melaninas de origem natural, sugerem a ausência de diferenças significativas na composição estrutural das melaninas extraídas dos dois organismos marinhos (polvo e choco). A diferença mais relevante entre estas melaninas de origem natural relaciona-se com o maior conteúdo em metais registado para a melanina do choco (Tabela 3). O conteúdo em metais poderá estar relacionado com uma das principais funções atribuídas às melaninas em sistemas biológicos, onde uma elevada capacidade de complexação de iões metálicos deverá desempenhar um papel fundamental na protecção das células contra possíveis danos citotóxicos, ou noutras necessidades específicas do organismo.

No entanto, comparando as melaninas de origem natural e sintética, as diferenças revelam-se mais evidentes. A nível estrutural, estas melaninas apresentam um comportamento semelhante ao longo de toda a gama de números de onda, com excepção do intervalo de frequências  $1750\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ , característico de alguns dos modos normais de vibração da ligação C-O. Neste intervalo, o aparecimento de uma banda extra de média intensidade a  $1714\text{ cm}^{-1}$ , no espectro referente à amostra MCO, poderá revelar a presença de grupos carboxilo protonados, uma vez que esta frequência é característica da elongação da ligação C=O neste tipo de grupos [41]. Esta observação poderá ser suportada pelos resultados obtidos na análise EDS (Tabela 3), onde a composição em metais dos dois tipos de melaninas (de origem natural e

sintética) parece ser bastante distinta. A ausência de iões divalentes (que habitualmente se ligam aos grupos carboxilo das melaninas) na amostra MCO poderá proporcionar a existência destes grupos protonados. No entanto, o pH do meio em que esta melanina foi sintetizada poderá igualmente contribuir para a presença destes grupos, tendo em conta o seu pKa (4,5).

A presença de grupos carboxilo na estrutura da melanina, bem como de anéis aromáticos e de grupos fenólicos, é também evidenciada pelas bandas situadas a frequências  $1400\text{ cm}^{-1}$  e  $1620\text{ cm}^{-1}$ . Enquanto a segunda poderá estar associada à elongação assimétrica de grupos  $\text{COO}^-$  e elongação da ligação  $\text{C}=\text{C}$  em aromáticos, a primeira não só confirma a presença destes grupos carboxilo, como evidencia ainda a existência de grupos fenólicos na estrutura das melaninas (elongação simétrica  $\text{COO}^-$ , vibrações de  $\text{C}=\text{C}$  no plano, elongação  $\text{C}-\text{O}$  em fenóis) [42].

A frequências superiores a este intervalo ( $1750\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ ), nota-se a presença de uma banda larga ( $3450\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ ) nas três amostras de melanina (MChL, MPL e MCO). Esta banda encontra-se vulgarmente associada às elongações das ligações  $\text{O}-\text{H}$  e  $\text{N}-\text{H}$ , constituindo mais uma indicação da presença de grupos fenólicos, carboxílicos e amina na estrutura da melanina.

A valores de números de onda inferiores ao referido intervalo, ocorre a presença de uma banda bastante intensa próxima dos  $1020\text{ cm}^{-1}$  (característica da elongação  $\text{C}-\text{N}$ ), a qual poderá derivar das unidades pirrólicas que compõem a estrutura das melaninas [42].

Até ao momento, a análise do espectro IV das melaninas direcciona para a presença das unidades monoméricas DHI e DHICA. A banda intensa observada na zona dos  $770\text{--}735\text{ cm}^{-1}$  poderá também suportar a presença destas unidades, uma vez que é característica das vibrações “bending” da ligação  $\text{C}-\text{H}$  para fora do plano, em anéis aromáticos dissustituídos.

A análise dos espectros obtidos por MALDI (Figura 16), permite concluir que as espécies oligoméricas de menor massa molecular que se formam no decorrer do processo de síntese das melaninas se revelam bastante semelhantes, em virtude dos



vários picos comuns que ocorrem a razões  $m/z$  inferiores a 800 Da. No entanto, os picos de maior abundância obtidos ao longo do espectro de massa revelaram-se diferentes dos verificados em estudos anteriores, realizados em melanina isolada da tinta de choco (Tabela 5). No entanto, importa realçar que a preparação das nossas amostras foi um pouco diferente da realizada nesses estudos [38, 39]. Apesar disto, os resultados obtidos para a amostra MChDE sugerem, igualmente, a presença de unidades oligoméricas parcialmente degradadas, o que poderá suportar a hipótese da ocorrência de um eventual processo de degradação da melanina com o decorrer do tempo.

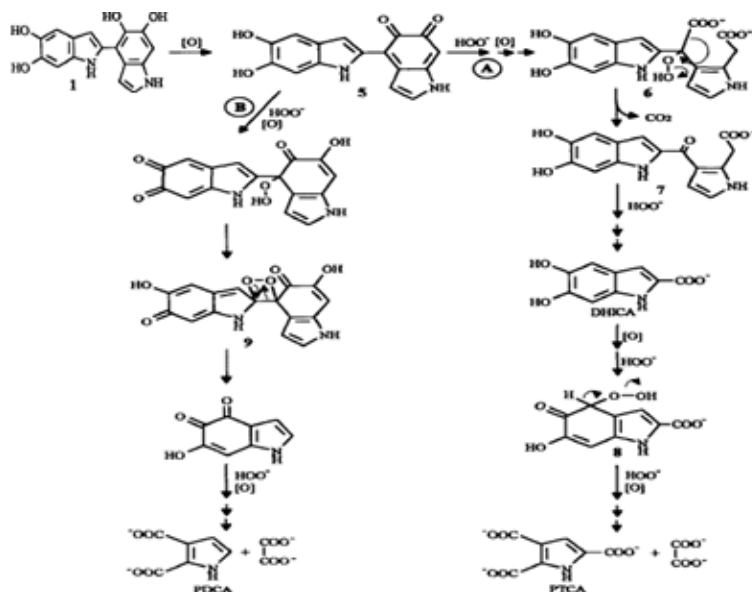
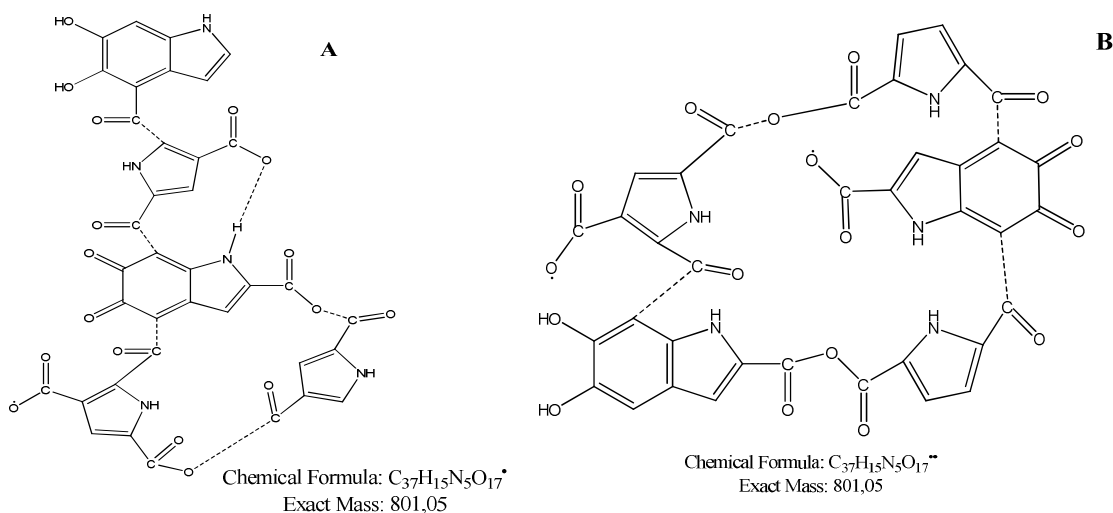


Figura 21 - Esquema de degradação oxidativa de DHI e DHICA a PDCA e PTCA [33]

Uma análise dos picos de massa mais intensos obtidos para a amostra MChDE, bem como das diferenças registadas entre eles, permite propor duas possíveis estruturas oligoméricas com massa de 801 Da (Figura 22).



**Figura 22** - Estruturas propostas com massa 801,05 Da para a melanina MChDE. As ligações a tracejado representam os locais por onde é possível partir a molécula, obtendo-se unidades oligoméricas de  $m/z$  313, 501, 637 Da

Considerando a existência de um possível processo de degradação da melanina, estas estruturas oligoméricas seriam fundamentalmente compostas por unidades DHI e DHICA, em conjunto com as resultantes do seu processo de degradação oxidativa, PDCA e PTCA. A disposição espacial destas unidades na estrutura do biopolímero poderá ser bastante variável, fornecendo ao material uma heterogeneidade acrescida.

Por outro lado, apesar da preferência de polimerização pelas posições 4 e 7 dos anéis aromáticos das unidades de DHICA, não é de excluir a hipótese do processo de polimerização ocorrer também por condensação, acrescentando ainda mais a desorganização estrutural do biopolímero.

A valores  $m/z > 800$  Da, as diferenças entre as amostras MChDE e MCO revelam-se mais acentuadas. Na primeira observam-se variações constantes de massa de 44,02 Da desde  $m/z = 801$  até  $m/z = 1285$ , as quais poderão ser características da molécula de  $\text{CO}_2$ . Esta ocorrência poderá ser indicativa da presença de grupos carboxilo nas extremidades dos oligómeros de melanina de maior massa molecular, encontrando-se mais disponíveis a fragmentação. No entanto, as cerca de 12 moléculas de  $\text{CO}_2$  que preenchem o intervalo de massas acima referido ( $12 \times 44,00$  Da) poderão ser não só derivadas das espécies oligoméricas de melanina presentes, mas também de resíduos de aminoácidos livres resultantes do processo de purificação da melanina, cuja presença poderá dever-se a uma deficiente lavagem do material.

A ausência de picos com relativa intensidade a valores de  $m/z$  superiores a 800 Da no espectro de massa da amostra de melanina comercial poderá estar relacionada com o seu processo de síntese, uma vez que a dimensão linear dos oligómeros encontra-se dependente da solubilidade destes no meio reaccional. Quando atingem o limite de solubilidade, os oligómeros sofrem uma reestruturação, rearranjando-se de modo a diminuir os efeitos de solvatação. Assim, é expectável que não se observem no espectro de massa oligómeros de massa molecular considerável, dada a característica insolubilidade das melaninas [43]. Neste contexto, o facto de a melanina de origem natural ser biosintetizada em organelos específicos e num suporte de natureza

proteica poderá favorecer a formação destes oligómeros de maior massa molecular, originando uma grande quantidade de picos nesta zona do espectro (Figura 16A).

Por fim, torna-se importante realçar alguma semelhança entre as unidades oligoméricas mais pequenas que iniciam o processo de polimerização, destacando-se a concordância no valor de  $m/z$  ao qual surge o primeiro pico nos espectros de massa de ambas as amostras de melanina (313 Da).

A concluir, interessa salientar que as estruturas propostas na figura 22 são apenas estruturas hipotéticas, dado que os estudos de massa realizados nestas melaninas necessitam de ser aprofundados. De forma a retirar conclusões mais sólidas acerca do mecanismo de polimerização e arranjo estrutural das melaninas de origem natural e sintética, seria necessário proceder-se à análise MS/MS dos picos mais intensos, de modo a verificar a presença de fragmentos que suportassem as estruturas propostas. Por outro lado, seria igualmente fundamental perceber a influência da digestão enzimática realizada na amostra MChL, bem como das hidrólises realizadas nas amostras MChDE e MCO durante a sua preparação. Para isso, seria imprescindível obter o espectro de massa de uma amostra de melanina que não tenha sido submetida a nenhum dos processos anteriores, e estabelecer a comparação. Por fim, a escassez de estudos de espectrometria de massa em melaninas de origem natural, associada à diversidade de resultados obtidos nas análises até então realizadas, faz com que a sugestão de estruturas e mecanismos de polimerização seja uma tarefa complicada, mas ao mesmo tempo aliciante [38, 39].

No que se refere à influência dos processos utilizados na purificação das melaninas de origem natural (MChL e MPL), os resultados obtidos da análise IV (Figuras 12 e 13) sugerem que a aplicação dos processos de digestão às melaninas, depois de ter sido efectuada a sua extracção e secagem, não provocam acentuadas diferenças na composição estrutural do biopolímero. No entanto, ensaios de degradação oxidativa ( $H_2O_2$  em meio alcalino) das melaninas purificadas e identificação dos produtos resultantes por HPLC seriam fundamentais na confirmação desta hipótese. Neste ponto, torna-se também importante destacar a eficácia das purificações executadas, tendo sido detectada a presença de fracção proteica nos

sobrenadantes resultantes dos vários processos de digestão. No entanto, o ensaio foi apenas qualitativo; uma quantificação da proteína presente no sobrenadante proporcionaria mais informação acerca do sucesso dos processos de purificação.

A reduzida influência dos métodos de digestão aplicados às melaninas manifestou-se também ao nível da sua composição elementar (Tabela 3). Neste campo, destaca-se sobretudo um aumento do conteúdo detectável em metais nas melaninas submetidas a digestão ácida, o que poderá ser derivado do meio utilizado na execução deste processo. Valores de pH reduzidos induzem a protonação dos grupos carboxilo presentes nas unidades monoméricas da melanina ( $pK_a = 4,5$ ), promovendo a libertação de alguns metais que se encontrem complexados por estes grupos, especialmente os que em solução formem iões divalentes, como é o caso do  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  [44].

Estas observações, que destacam a ausência de alterações significativas a nível estrutural das melaninas mediante a aplicação de processos de purificação que envolvam digestões ácidas ou enzimáticas, vêm contrariar resultados obtidos em estudos anteriores [20]. Possivelmente, as alterações a nível estrutural observadas noutros estudos, deverão apenas ocorrer quando estas digestões são aplicadas durante o processo de extracção do pigmento, e não quando este já se encontra isolado e estabilizado (neste caso, seco por liofilização).

Assim sendo, a possibilidade de separação da fracção proteica e da parte cromófora da melanina, mantendo a sua estrutura nativa, fornece um novo alento no que corresponde à investigação das propriedades estruturais e mecanismos de polimerização destes pigmentos, na medida em que poderá evitar a interferência de possíveis artefactos que poderão derivar da fracção proteica agregada. Deste modo, torna-se também possível avaliar a função da proteína tanto nas propriedades da melanina, como nos seus processos de agregação e polimerização.

Além destas observações, também o tratamento térmico a que foram submetidas as melaninas obtidas dos organismos marinhos é indicativo da elevada resistência deste material. O facto de se transitar de uma estrutura completamente

amorfa para uma estrutura com um certo grau de cristalinidade, submetendo a melanina a temperaturas relativamente elevadas (500 °C), realça a elasticidade e a resistência deste biopolímero.

Os resultados de DRX obtidos indicam a presença de, pelo menos, duas fases que cristalizam. Enquanto uma delas deverá pertencer ao  $\text{CaCO}_3$  (na forma de calcite), uma outra poderá ser resultante da cristalização de uma unidade fundamental da melanina que ainda se mantém a estas temperaturas, dada a ocorrência de uma série de picos com valores de espaçamento  $d$  comuns entre as amostras de melanina tratadas termicamente. A presença destes picos reflecte-se especialmente nas melaninas submetidas a um aquecimento mais rápido. Por outro lado, as condições de aquecimento deverão influenciar a forma como essa unidade fundamental cristaliza, resultando no aparecimento de diferentes picos nos difractogramas. A resistência deste material à temperatura de 500 °C é suportada pelos espectros IV obtidos da análise das melaninas tratadas termicamente (Figura 15), onde se destaca a presença de algumas bandas, embora de menor intensidade, características da melanina. A menor intensidade das bandas revela alguma decomposição do biopolímero, embora esta possa não ocorrer na sua totalidade. A presença de  $\text{CaCO}_3$  nas amostras de melaninas de origem natural aquecidas a 500 °C é evidenciada também na análise IV, através da formação de duas bandas intensas nos intervalos de números de onda 1490-1410 e 880-860  $\text{cm}^{-1}$ , características da presença de iões carbonato. Estas bandas revelam-se bastante intensas nas amostras tratadas a 500 °C, apesar de na amostra MChL400 existirem já vestígios da presença deste composto (Figura 14). No entanto, no difractograma correspondente a esta última amostra (Figura 18), a presença de  $\text{CaCO}_3$  não foi detectada, pelo que a sua formação a esta temperatura deverá ser residual.

O diferente aspecto físico (coloração) evidenciado pelas melaninas resultantes dos diversos tratamentos térmicos poderá ser indicativo de que determinadas condições de aquecimento favoreçam a formação de  $\text{CaCO}_3$ . Um tratamento térmico que envolva um aquecimento prolongado a patamares de temperatura inferiores a 500 °C favorece a formação de um composto com coloração branca mais acentuada.

Por outro lado, quando o tratamento térmico envolve apenas um patamar de temperatura onde o aquecimento é mais prolongado (500 °C), a quantidade de picos no difractograma referentes ao carbonato de cálcio diminui significativamente, apresentando o composto final uma coloração acinzentada. Assim, pode-se concluir que um tratamento térmico que envolva um mais lento favorece a cristalização do  $\text{CaCO}_3$ , possivelmente em virtude de uma maior decomposição da melanina.

Esta última observação é confirmada pela análise do difractograma obtido para a amostra MChCinz, onde um aquecimento adicional da amostra MChL6 favoreceu a cristalização do  $\text{CaCO}_3$ , associada a um ligeiro atenuar da coloração (Anexo I, Tabela C). Por outro lado, verificou-se também o aumento de intensidade dos picos já existentes, bem como o aparecimento de picos adicionais semelhantes a outros detectados nas restantes amostras de melanina. Estes picos poderão corresponder, como já foi referido, a alguma forma de cristalização da melanina.

A análise elementar das melaninas aquecidas a 500 °C suporta a ocorrência de decomposição do pigmento a esta temperatura, verificando-se um acentuado decréscimo nos níveis de carbono relativamente às amostras de partida MChL e MPL. O acentuado aumento nos níveis de Ca e Mg, associado ao aumento verificado na quantidade de oxigénio poderá ser indicativo da formação de óxidos ou carbonatos metálicos, em virtude de os tratamentos térmicos terem ocorrido em atmosfera de ar. No entanto, não foram detectados vestígios deste tipo de compostos nos difractogramas obtidos. É de salientar o facto de a composição elementar das melaninas tratadas termicamente não variar significativamente consoante as condições de aquecimento e o tempo que permanecem à temperatura de 500 °C (Tabela 4).

A análise estrutural das melaninas tratadas termicamente revela que este biopolímero apresenta uma estabilidade a elevadas temperaturas que não é de todo habitual em moléculas de origem biológica. Esta estabilidade poderá estender o leque de aplicações deste pigmento a áreas que exijam materiais com elevada resistência térmica.

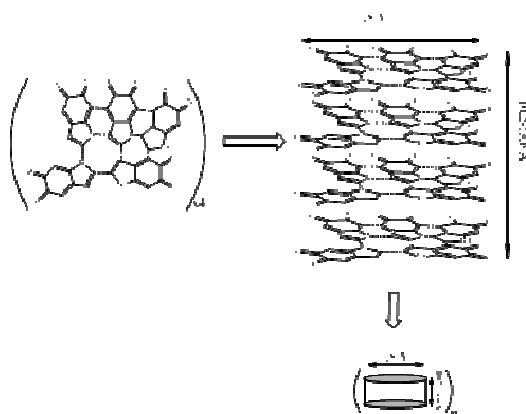
No entanto, técnicas adicionais como espectrometria de massa seriam necessárias para descobrir mais informação acerca da identidade dos compostos resultantes do tratamento térmico da melanina de origem natural. Por outro lado, em virtude da cristalinidade exibida por estes compostos, seria igualmente interessante estudar as suas propriedades eléctricas, comparando-as com as do composto de partida, o qual tem características de semicondutor amorfo [26]. Este estudo abriria uma nova perspectiva sobre as propriedades eléctricas das melaninas, proporcionando novas aplicações neste campo.

## 4. Caracterização morfológica

### 4.1 Introdução

A necessidade de encontrar uma justificação, a nível estrutural, para as inúmeras propriedades exibidas pelas melaninas motivou o aparecimento de dois modelos: modelo heteropolimérico e modelo oligomérico. Enquanto o primeiro considera a desordem estrutural (em virtude da diversidade química das espécies presentes e da possibilidade de ocorrência de várias formas de polimerização) como a grande responsável pelas propriedades exibidas pelas melaninas, o segundo destaca a existência de uma certa organização ao nível das estruturas primárias da melanina. Esta organização traduz-se pela formação de oligómeros planares compostos por 5 a 6 unidades de indole-quinonas. Segundo o modelo oligomérico, estes oligómeros encontram-se sobrepostos em 3-4 camadas, sendo estabilizados por forças Van Der Waals, interações  $\pi$  e ligações covalentes, originando a formação de uma unidade fundamental de dimensão lateral 15 Å e altura entre 10.2 – 13.6 Å (Figura 23). A agregação de diversas unidades com estas características resultaria na formação da melanina [23].

Este último modelo, proposto inicialmente como resultado de estudos de raios-X (WAXS e SAXS) realizados em melaninas [45, 46], tem sido amplamente suportado pela maioria dos estudos que envolvem a análise morfológica de melanina extraída da tinta de choco. Assim, técnicas de microscopia como SEM, TEM e AFM têm-se revelado ferramentas importantes no estudo da validade do modelo oligomérico [20].



**Figura 23** - Representação esquemática do processo inicial de agregação da melanina (modelo oligomérico)<sup>[20]</sup>



No âmbito desta tese, a utilização destas técnicas de microscopia na análise das melaninas extraídas do polvo e do choco tiveram como principal objectivo estudar a influência da aplicação dos métodos de purificação, secagem e tratamento térmico na morfologia destes biopolímeros.

Assim, a análise morfológica das melaninas modificadas (purificadas, tratadas termicamente e submetidas a processos de secagem distintos) foi realizada recorrendo à técnica de microscopia electrónica de varrimento. Com o objectivo de obter mais informação acerca das alterações a nível morfológico nas melaninas tratadas termicamente, técnicas de microscopia mais potentes como AFM e TEM foram também utilizadas no estudo das amostras de melanina MChL e MCh500\_6H.

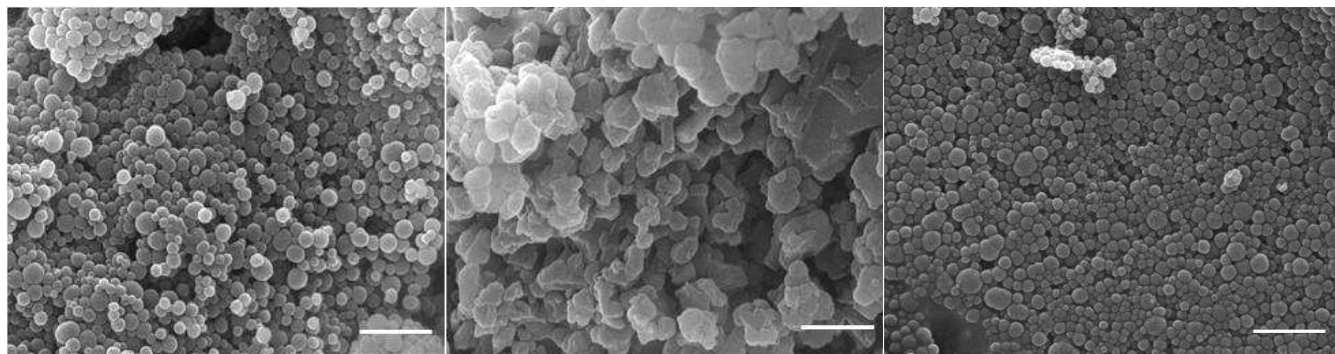
## **4.2 Microscopia electrónica de varrimento – Análise morfológica**

### **4.2.1 Descrição e modo de execução**

O conteúdo deste parágrafo encontra-se descrito no subcapítulo 3.2.1.

### **4.2.2 Resultados**

Procedeu-se em primeiro lugar à comparação entre melaninas de diferentes origens, tendo-se considerado as amostras MChL, MPL e MCO.

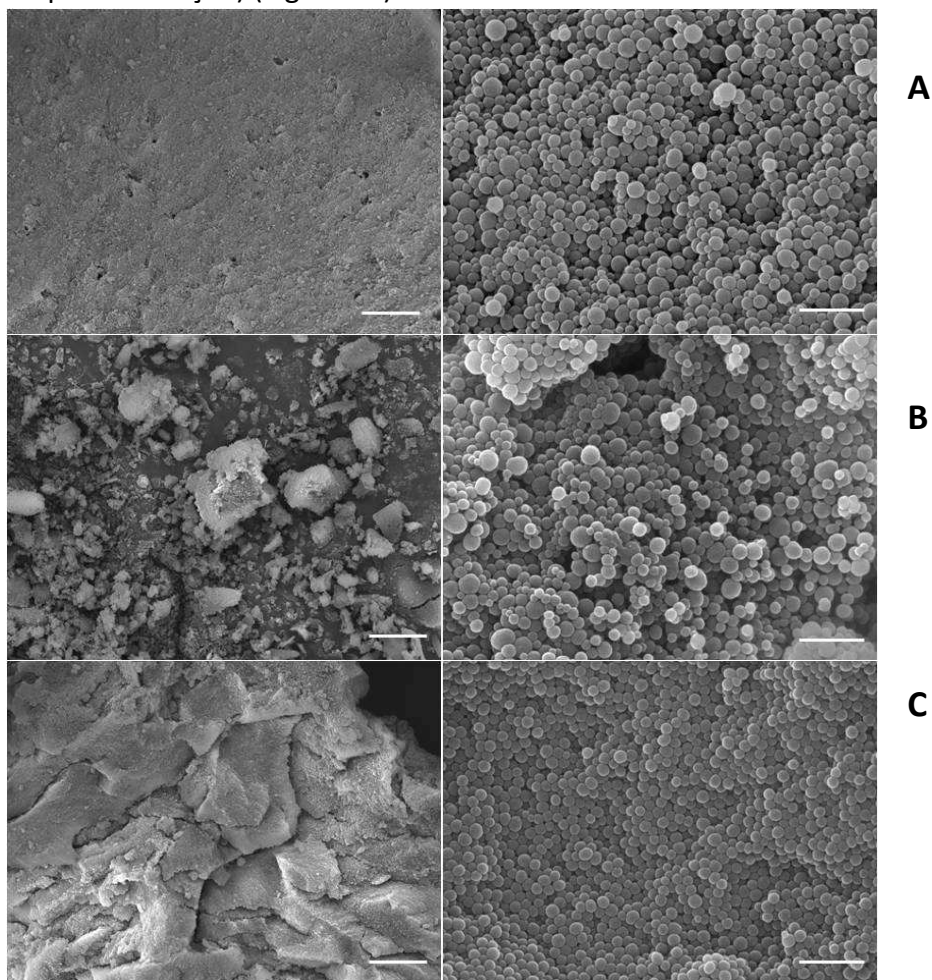


**Figura 24** - Imagens SEM amostras MChL (esquerda), MCO (meio), MPL (direita). A barra de escala é de 1  $\mu\text{m}$

As imagens SEM obtidas para estas três amostras demonstram a ocorrência de acentuadas diferenças a nível morfológico entre as melaninas de origem natural (MChL e MPL) e a melanina sintética (MCO). Enquanto a amostra MCO apresenta uma morfologia amorfa, composta por agregados com uma densidade não uniforme e uma superfície aparentemente não rugosa, as amostras MChL e MPL são dotadas de alguma organização a nível morfológico, exibindo uma estrutura granular de simetria

esférica. Porém, entre as amostras de origem natural distinta (MChL e MPL), não se destacam diferenças significativas ao nível da sua morfologia.

No que se refere às melaninas submetidas a diferentes métodos de secagem, procedeu-se à análise das amostras MChAr (seca ao ar), MCh100 (seca a 100 °C) e MChL (seca por liofilização) (Figura 25).

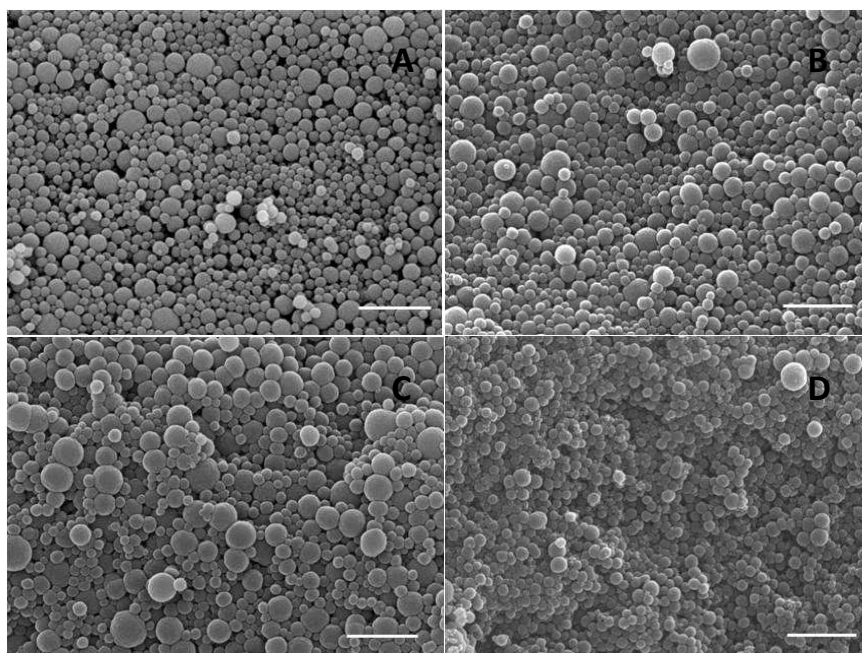


**Figura 25** - Imagens SEM amostras MCh100 (A), MChL (B) e MChAr (C). A barra de escala é de 10 µm para as imagens da coluna esquerda e 1 µm para as imagens da coluna direita

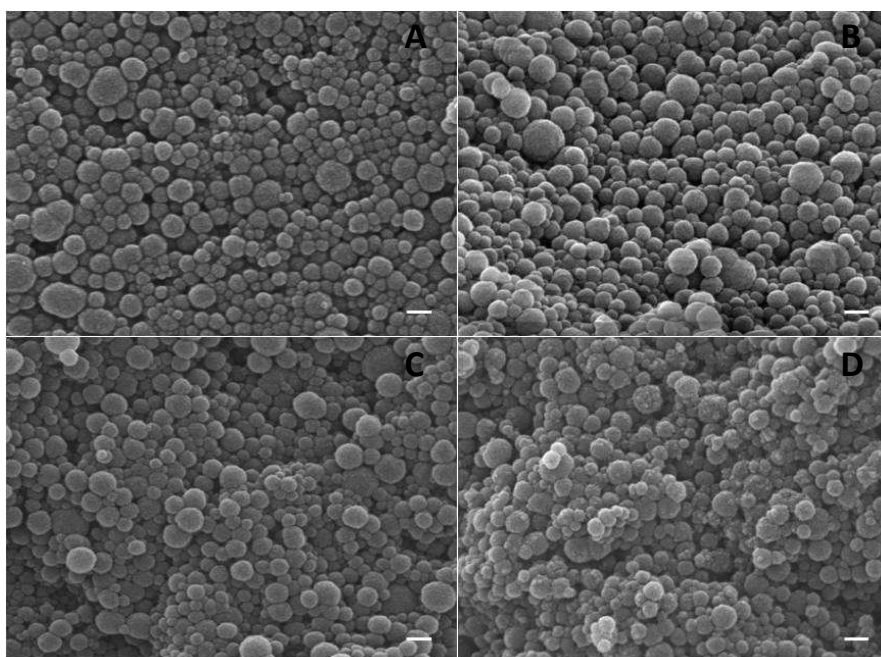
Enquanto a nível macroscópico as amostras MCh100 e MChAr exibem uma organização mais compacta comparativamente à melanina MChL (Figura 25, coluna esquerda), a nível microscópico as diferenças entre estas amostras são menos evidentes (Figura 25, coluna direita), persistindo as estruturas granulares esféricas características deste tipo de melanina.

No que se refere à influência dos métodos de purificação na morfologia das melaninas extraídas da tinta de polvo e choco, as imagens obtidas (Figuras 26 e 27)

não divergem das apresentadas para as amostras de partida MChL e MPL (Figura 22), mantendo-se a estrutura granular característica destes compostos.



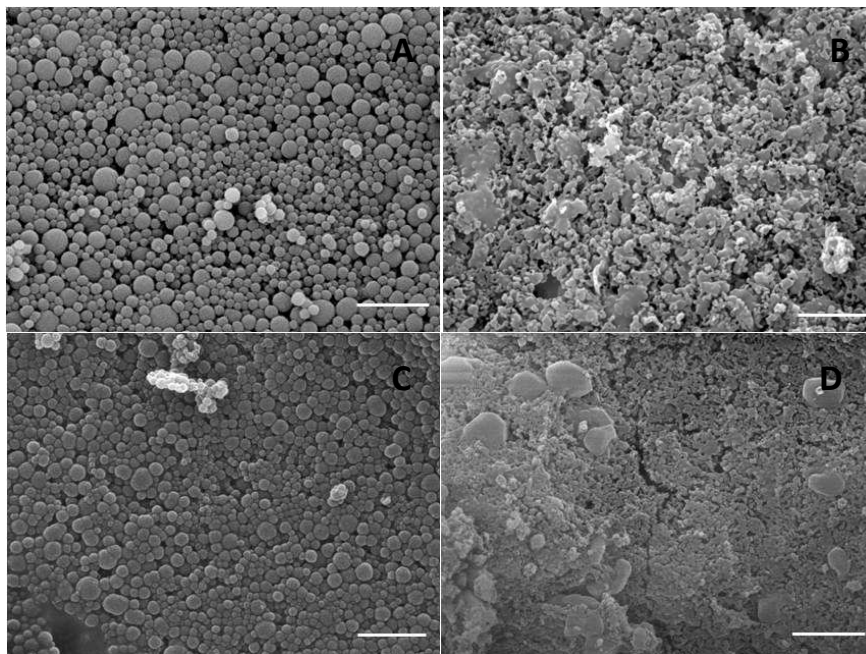
**Figura 26** - Imagens SEM amostras MChL (A), MChDE (B), MChDQ (C), MChHF (D). A barra de escala é de 1  $\mu\text{m}$



**Figura 27** - Imagens SEM amostras MPL (A), MPDE (B), MPDQ (C), MPHf (D). A barra de escala é de 100 nm

Nas imagens anteriores é também visível, à superfície dos grânulos esféricos, a presença de pequenas subestruturas, evidenciadas principalmente na imagem correspondente à amostra MPHf (**Figura 27**).

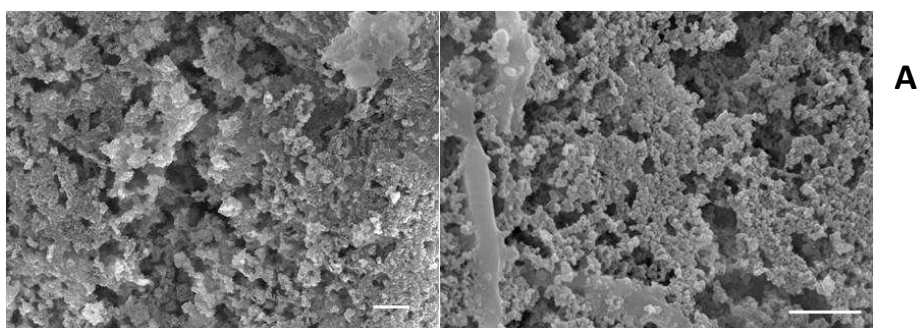
Por sua vez, quando se procede ao tratamento térmico da melanina, as diferenças a nível morfológico entre a amostra final e a amostra de partida revelam-se significativas (Figura 28).

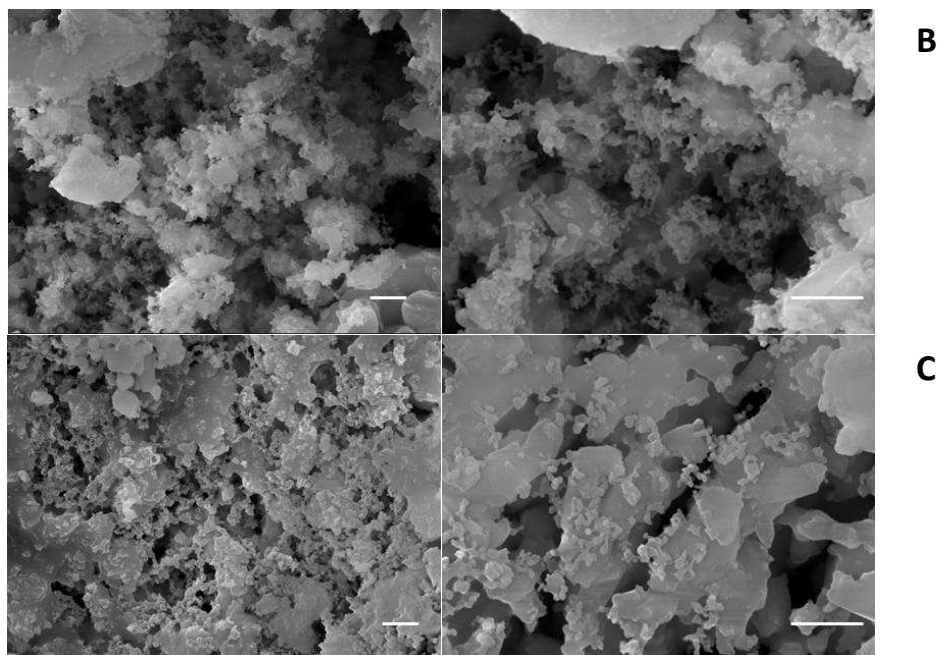


**Figura 28** - Imagens SEM amostras MChL (1), MChL500\_6H (2), MPL (3), MPLB (4). A barra de escala é de 1  $\mu\text{m}$ .

Após o tratamento térmico a 500 °C, observa-se uma destruição parcial das partículas esféricas, com consequente perda de rugosidade (Figura 28, coluna direita). No entanto, são ainda visíveis estruturas esféricas que persistem após o tratamento.

A influência do tempo de aquecimento da amostra de melanina extraída do choco (MChL) foi também estudada por microscopia electrónica de varrimento (Figura 29).





**Figura 29** - Imagens SEM amostras submetidas a diferentes tempos de aquecimento MChL500\_24 (A), MChL500\_48 (B), MChL500\_72 (C). A barra de escala é de 100 nm (esquerda) e 1  $\mu$ m (direita)

Neste caso, são visíveis alterações sucessivas no material à medida que se aumenta o período de exposição da amostra a 500 °C, denotando-se uma maior predominância das estruturas lisas na amostra MChL500\_72 comparativamente à amostra MChL500\_24.

A análise das amostras MChL500\_24 e MChL500\_6H permite ainda concluir sobre a influência das condições de aquecimento na morfologia final do biopolímero, observando-se uma maior predominância de estruturas lisas presentes nesta última amostra, o que poderá ser indicativo de uma maior decomposição da melanina.

### 4.3 Microscopia Electrónica de Transmissão

#### 4.3.1 Descrição e modo de execução

Na técnica de microscopia electrónica de transmissão, a amostra é trespassada por um feixe de electrões, originando-se uma imagem resultante do “scattering” elástico e inelástico dos electrões. A imagem de contraste obtida depende não só da absorção dos electrões por parte do material, mas também da espessura e composição deste último.

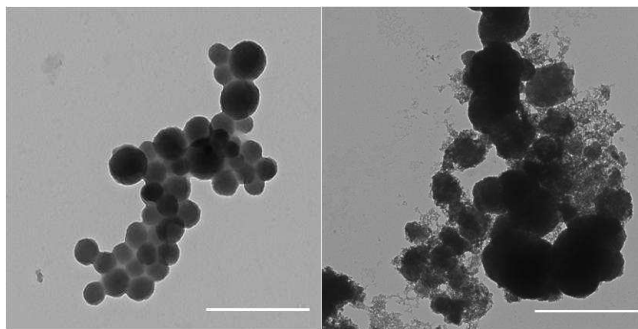
Esta técnica de microscopia permite a observação do material à escala atômica (resolução 10 Å – 1000 Å), tornando possível a detecção/identificação de defeitos no cristal, como deslocamentos ou a presença de diferentes fases.

**Materiais:** As imagens foram adquiridas num TEM Philips 420, com uma voltagem de aceleração de 120 kV.

**Métodos:** Na preparação das amostras para análise TEM, uma dispersão de melanina em água foi depositada numa grelha de cobre revestida a carbono (específica para TEM), deixando-se secar à temperatura ambiente.

### 4.3.2 Resultados

A permanência de algumas estruturas granulares esféricas após o tratamento térmico das melaninas (Figura 28) despertou a curiosidade quanto à morfologia do composto final obtido. Deste modo, recorreu-se ao uso outras técnicas de microscopia que permitissem obter informação mais aprofundada sobre este tema. Assim, tendo em conta a capacidade da microscopia electrónica de transmissão em fornecer informação à escala atômica, procedeu-se à análise das amostras MChL e MChL500\_6H utilizando-se esta técnica.



**Figura 30** - Imagens TEM amostra MChL (esquerda) e MChL500\_6H (direita). A barra de escala é de 500 nm.

As imagens TEM obtidas evidenciam, uma vez mais, a ocorrência de uma destruição parcial das estruturas granulares esféricas em consequência do tratamento térmico a que foi submetida a melanina (Figura 30).

Na imagem correspondente à amostra MChL, torna-se importante destacar a agregação de estruturas mais pequenas, dando origem a estruturas granulares de maior dimensão.

## 4.4 Microscopia de Força Atômica

### 4.4.1 Descrição e modo de execução

A microscopia de força atômica (AFM) baseia-se nas interações que ocorrem entre a superfície da amostra e uma ponta localizada na extremidade de um braço de silício (cantilever). A interação entre a amostra e a ponta é traduzida por uma deflexão no cantilever, podendo desta forma ser identificado o tipo de força presente (magnéticas, electrostáticas, interatómicas) [47]. A ocorrência destas interações permite a obtenção de uma imagem tridimensional da superfície da amostra, razão pela qual o AFM é considerado uma técnica bastante útil no estudo da topografia de um material.

No que se refere ao estudo das melaninas, as imagens foram adquiridas em modo “tapping”, no qual a ponta apenas toca na amostra no final de cada ciclo de oscilação do cantilever [48]. Este modo de operação reduz a probabilidade de se danificar a superfície da amostra e a ponta, revelando-se bastante útil na análise de amostras desconhecidas.

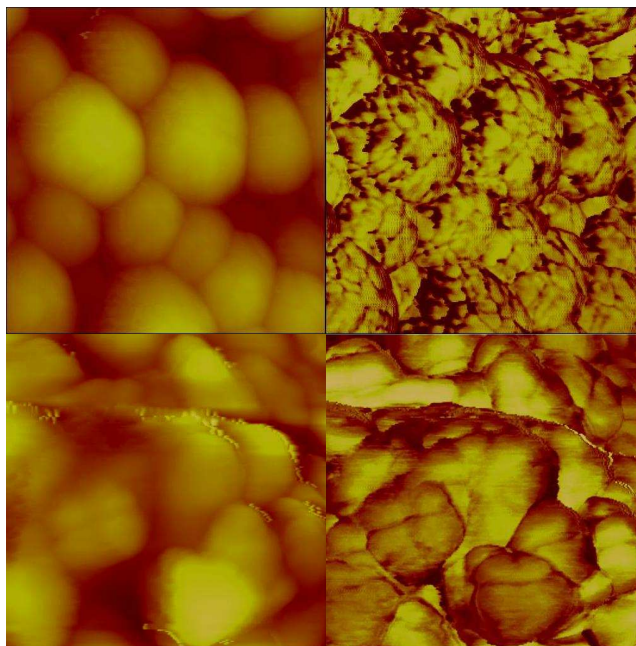
**Materiais:** As imagens foram adquiridas utilizando um AFM Digital Instruments Multimode Nanoscope IIIa, operando em modo “tapping” à temperatura ambiente e em atmosfera de ar. A recolha das imagens foi efectuada com o auxílio de um cantilever de silício, a uma frequência de oscilação de 300 KHz e uma velocidade de varrimento de 1,8 Hz.

**Métodos:** A preparação das amostras para AFM consistiu na deposição de uma suspensão de melanina (em acetona) numa superfície de mica, deixando-se secar ao ar.

### 4.4.2 Resultados

As amostras MChL e MChL500\_6H foram analisadas quanto à sua topografia, recorrendo-se à técnica de microscopia de força atômica. A utilização desta técnica permite concluir não só sobre a dimensão das estruturas granulares observadas à superfície do material, mas também acerca da sua rugosidade.





**Figura 31** - Imagens AFM da amostra MChL (cima) e MChL500\_6H (baixo). As imagens da esquerda representam a imagem em altura, enquanto as da direita a imagem de fase

Nas imagens obtidas, são evidentes as alterações provocadas pelo tratamento térmico da melanina extraída da tinta de choco. A presença de algumas estruturas granulares de simetria esférica e a perda de rugosidade superficial são dois pontos importantes a salientar na análise das imagens AFM correspondentes à amostra MChL500\_6H (Figura 31). No entanto, a baixa qualidade desta imagem impede a realização de uma análise mais aprofundada e rigorosa.

Por outro lado, é bem visível na imagem de fase da amostra MChL a presença de subestruturas à superfície dos grânulos de simetria esférica, cujo diâmetro varia entre 100-200 nm. Estas subestruturas parecem ter sido destruídas durante o tratamento térmico da melanina (Figura 31), resultando assim numa perda de rugosidade dos grânulos.

#### 4.5 Discussão de resultados

A análise das diversas melaninas por microscopia electrónica de varrimento permitiu concluir que os diferentes métodos de digestão utilizados na purificação das melaninas extraídas da tinta do choco e do polvo não promoveram alterações significativas ao nível do seu arranjo morfológico. A estrutura granular esférica, característica das amostras de melanina de partida, mantém-se mesmo após a exposição destas a meios extremamente agressivos. No entanto, a utilização de



diferentes métodos de secagem nas melaninas poderão produzir alterações a nível macroscópico, especialmente no seu grau de agregação. Neste contexto, as amostras MChAr e MCh100 apresentam uma morfologia mais compacta e mais agregada (a nível macroscópico) relativamente à melanina seca por liofilização (MChL). Este resultado poderá ser consequência da tensão superficial a que estão sujeitas as amostras durante os vários processos de secagem. Assim, quando o processo de secagem é efectuado a 100 °C e à temperatura ambiente, verifica-se uma maior tendência para a formação de agregados em virtude da tensão superficial provocada pela interface sólido/solução/gás, como forma de contrariar a energia daí resultante. Por sua vez, a amostra seca por liofilização apresenta um menor grau de agregação, resultado da menor energia decorrente da interface sólido/gás e de uma menor tensão superficial envolvida. O grau de agregação poderá afectar a porosidade do grão, bem como a área superficial.

No que se refere à origem das melaninas, a organização morfológica das melaninas de origem natural contrasta com a heterogeneidade e desorganização verificada na melanina sintética. A ausência de uma simetria bem definida a nível granular neste tipo de melanina opõe-se às estruturas granulares esféricas observadas nas melaninas de origem natural, o que poderá ter repercussões ao nível das propriedades macroscópicas. A morfologia amorfa demonstrada pela melanina sintética, bem como a ausência de um elevado grau de agregação das nanopartículas deverá ser resultado não só da reduzida solubilidade das melaninas, mas também das condições de síntese utilizadas.

Por outro lado, a morfologia organizada verificada nas melaninas de origem natural poderá ser resultante do facto de a síntese deste pigmento, em sistemas biológicos, ocorrer em organelos especializados (melanossomas) e com a colaboração de diversas enzimas, promovendo uma polimerização direccionada e um elevado nível de agregação.

A análise da amostra MChL recorrendo a outras técnicas de microscopia como AFM e TEM, permitiram confirmar a dimensão dos grânulos de simetria esférica que compõem a estrutura da melanina (100-200 nm), destacando-se igualmente a

rugosidade da superfície dos mesmos. Por outro lado, torna-se também importante realçar a observação de subestruturas à superfície destes grânulos. Estas têm uma dimensão cerca de 10 vezes inferior comparativamente às partículas esféricas de maior dimensão, apresentando uma simetria planar que se assemelha a pequenas folhas. A existência destas subestruturas tinha já sido reportada em estudos morfológicos anteriores que envolviam técnicas como UHRSEM e AFM [20], e encontra-se de acordo com o modelo oligomérico representado na figura 23. Na análise TEM, a persistência das estruturas esféricas durante longos períodos de tempo sob um feixe de electrões de elevada energia (120 Kv), permite concluir que forças intermoleculares fortes deverão estar envolvidas na estabilização destas estruturas. As forças envolvidas na estabilização destes agregados poderão justificar a elevada resistência revelada por estes compostos, tanto a nível morfológico, como a nível estrutural.

Esta resistência revela-se não só mediante a aplicação de diferentes condições de secagem e métodos de purificação, mas também ao nível dos diferentes tratamentos térmicos a que foram sujeitas as melaninas. Neste contexto, torna-se importante realçar a presença de algumas partículas esféricas características da amostra de melanina inicial, mesmo depois de um tratamento da mesma a 500 °C, embora numa quantidade relativamente pequena comparativamente às estruturas lisas observadas.

A resistência de algumas estruturas esféricas a temperaturas elevadas poderá ser explicadas pela presença de interacções bastante fortes, como ligação covalente ou interacções hidrofóbicas. Por outro lado, ligações de Van Der Waals ou pontes de hidrogénio poderão igualmente estar envolvidas na formação da estrutura granular da melanina, mas poderão não constituir as principais forças envolvidas na estabilização dos agregados que compõem o aspecto morfológico da melanina.

## 5. Propriedades Ópticas

### 5.1 Introdução

Uma das principais características da melanina encontra-se relacionada com o seu carácter fotoprotector. Este atributo resulta do seu comportamento à luz UV-Vis, no qual se verifica um aumento exponencial da absorção com o decréscimo do comprimento de onda [10].

Este espectro de absorção revela-se atípico em cromóforos orgânicos, sendo provavelmente resultado de uma estrutura que apresenta uma considerável heterogeneidade e desordem – modelo heteropolimérico. A sobreposição de estados electrónicos de espécies quimicamente distintas poderá originar um comportamento UV-Vis semelhante ao verificado nas melaninas [21]. Esta sobreposição dos estados electrónicos e consequente deslocalização electrónica acentua-se mediante o “ $\pi$ -stacking” de unidades oligoméricas com carácter aromático – modelo oligomérico.

No entanto, outra característica que parece ser responsável pelo carácter fotoprotector atribuído às melaninas relaciona-se com a sua capacidade de conversão de energia fotónica em calor. Este poder de conversão é surpreendente, uma vez que cerca de 99% da energia fotónica absorvida é dissipada em forma de calor [26, 45]. Embora o mecanismo pelo qual este processo ocorre não se encontre completamente definido, pensa-se que uma rápida re-população do estado fundamental por parte dos electrões excitados esteja na origem deste comportamento, levando à emissão de apenas uma quantidade residual de energia. Deste modo, pode-se definir a melanina como um polímero onde se verifica a ocorrência de uma eficiente relaxação térmica, a qual evita a participação em reacções fotoquímicas susceptíveis de danificar o próprio polímero [26].

Por outro lado, a capacidade de captação de espécies radicalares livres por parte da melanina constitui também um papel fundamental na protecção do biopolímero, uma vez que o ataque destas espécies promove a sua degradação.

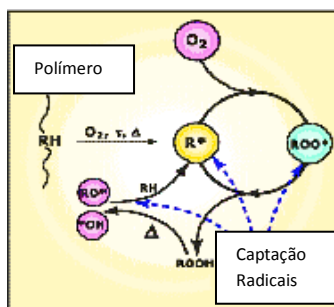


Figura 32 - Esquema de geração e captação de radicais livres<sup>[67]</sup>

A capacidade de captação destes radicais depende não só da composição estrutural do biopolímero, como também do seu grau de agregação [26]. Deste modo, o estudo do comportamento UV-Vis das melaninas de origem sintética e natural (modificadas e não modificadas), teve como objectivo estabelecer uma relação entre arranjo estrutural, morfológico e as propriedades ópticas destes pigmentos.

## 5.2 Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

### 5.2.1 Descrição e modo de execução

A técnica de espectroscopia ultravioleta-visível baseia-se na capacidade de absorção de energia por parte das moléculas, numa gama de comprimento de onda de 800-190 nm.

A energia absorvida provoca transições entre os níveis energéticos da molécula, originando bandas no espectro de UV-Vis. A abundância e proximidade dos níveis energéticos nas moléculas, aliada ao maior número de modos de vibração e rotação excitados que estas possuem (comparativamente a espécies atómicas), originam uma porção de linhas consecutivas correspondentes á sua excitação electrónica, vibracional e rotacional. A predominância destas linhas torna impossível a sua resolução, surgindo assim representadas por uma banda [36].

Deste modo, quanto maior o número de moléculas capazes de absorver luz a diversos comprimentos de onda, maior será a extensão da absorção de luz ao longo do espectro. A relação directa entre estas duas grandezas (concentração e absorção) é representada pela lei de Lambert-Beer:

$$A=\epsilon lc$$

onde  $A$  é a absorvância,  $\epsilon$  o coeficiente de extinção molar (característica intrínseca da molécula, que corresponde à eficiência de absorvância da radiação UV) e  $\ell$  o comprimento da célula.

Na análise espectroscópica das melaninas, a grandeza medida não foi a absorvância, mas sim a reflectância. O fundamento da técnica revela-se semelhante, embora a radiação quantificada seja aquela que é reflectida pelo material, e não a radiação transmitida como ocorre na espectroscopia de absorção. No entanto, a relação inversa entre absorvância e reflectância facilita a interpretação dos resultados obtidos.

A espectroscopia de reflectância é vulgarmente utilizada no estudo de amostras sólidas, em virtude do aspecto opaco e superfície irregular que estas apresentam. A utilização desta técnica no estudo das melaninas torna-se fundamental na compreensão do seu carácter fotoprotector.

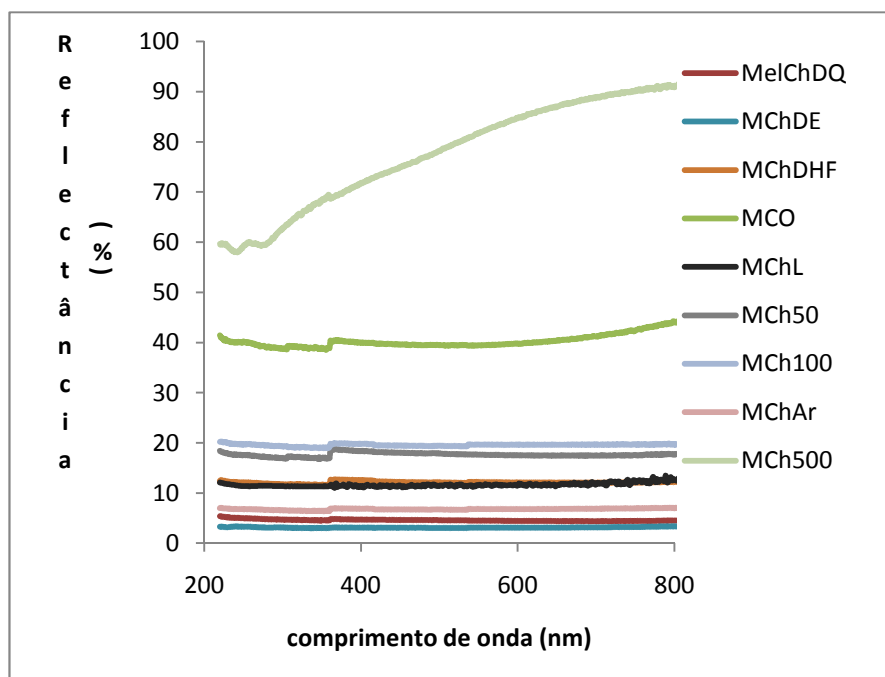
**Materiais:** O espectro UV-Vis foi traçado num espectrofotómetro Shimadzu UV-2450, no intervalo de comprimentos de onda 800-190 nm.

**Métodos:** A preparação da amostra para análise UV-Vis consistiu na diluição de cerca de 1 mg de melanina em sulfato de bário. Estes dois sólidos foram misturados até se obter uma coloração homogénea.

### 5.2.2 Resultados

Com o objectivo de avaliar o impacto que as modificações introduzidas na melanina isolada da tinta de choco poderiam produzir ao nível das suas propriedades ópticas, procedeu-se á análise das melaninas modificadas por espectroscopia UV-Vis de sólidos. Como termo de comparação, as amostras MChL e MCO foram igualmente analisadas por esta técnica (Figura 33).

## Melaninas de origem marinha: Caracterização Química e Termofísica



**Figura 33** – Espectro UV-Vis das melaninas naturais extraídas da tinta de choco (nativa e modificadas) e melanina sintética

A análise do espectro UV-Vis permite concluir que os métodos de purificação e secagem introduzidos não produziram alterações profundas nas características ópticas das melaninas. A maior absorção da radiação UV-Vis por parte das melaninas purificadas com digestão química e enzimática poderá ser resultado de efeitos de concentração, não se podendo retirar conclusões acerca da influência do tipo de digestão e do grau de hidratação das melaninas na sua capacidade fotoprotectora.

Por outro lado, a observação da Figura 33 permite também concluir que as melaninas de origem natural nativa (MChL) e resultantes dos diversos tratamentos (com excepção da amostra MChL500\_6H, resultante do tratamento térmico) apresentam uma maior capacidade fotoprotectora comparativamente á melanina sintética (obtida por oxidação da tirosina em presença de  $H_2O_2$ ). Porém, importa realçar o comportamento revelado pela amostra MChL500\_6H, onde se denota um aumento exponencial da absorção com o decréscimo do comprimento de onda. Contudo, os níveis de absorção revelados por esta amostra mantêm-se inferiores aos observados para as restantes amostras analisadas.

### 5.3 Discussão de resultados

A análise UV-Vis das diversas melaninas permitiu concluir que as características estruturais e morfológicas deverão desempenhar um papel importante no carácter fotoprotector destes biopolímeros.

A prova de que estes parâmetros poderão estar envolvidos na eficiência fotoprotectora destes pigmentos relaciona-se com o facto de se observarem diferenças significativas nos espectros UV-Vis das amostras MCO, MChL e MChL500\_6H. Estas divergências verificam-se tanto ao nível do comportamento registado ao longo de toda a gama de comprimentos de onda (800-190 nm), como da capacidade de absorção de radiação ultravioleta-visível.

O comportamento semelhante verificado ao longo do espectro entre as amostras MCO e MChL poderá ser consequência da sua composição estrutural. Em ambas as amostras de melanina, as unidades monoméricas DHI e DHICA, bem como unidades resultantes da oxidação destes monómeros, são predominantes na sua estrutura. A presença desta variedade de espécies na composição dos oligómeros de melanina origina uma sobreposição de níveis energéticos, verificando-se um maior número de transições electrónicas ao longo do espectro electromagnético e, consequentemente, uma extensão do espectro de absorção. Por outro lado, a aromaticidade das unidades que compõem a estrutura da melanina favorece uma deslocalização electrónica eficiente, o que contribui para a estabilização do polímero e, consequentemente, para um aumento da sua capacidade fotoprotectora. A disposição dos oligómeros na estrutura da melanina, segundo o modelo oligomérico (sobrepostos em camadas ou “ $\pi$ -stacking”), contribui igualmente para o comportamento UV-Vis revelado por estas duas amostras de melanina. Este arranjo dos oligómeros envolve uma maior sobreposição de níveis electrónicos e uma maior deslocalização electrónica, ampliando a capacidade fotoprotectora do biopolímero.

Embora estruturalmente as melaninas MCO e MChL pareçam semelhantes, no que se refere à sua morfologia estas amostras apresentam acentuadas diferenças. O maior grau de agregação verificado na amostra MChL favorece a estabilização do biopolímero quando exposto a radiação UV-Vis, uma vez que diminui a exposição das

suas unidades estruturais a reacções adversas com o oxigénio [26]. Deste modo, um maior grau de agregação é também sinónimo de maior eficiência na absorção da radiação UV-Vis por parte do polímero, bem como de uma menor reactividade química do mesmo.

Por outro lado, também as partículas granulares esféricas presentes na amostra MChL poderão influenciar as suas propriedades ópticas. Estas partículas, em virtude da sua maior área superficial, permitem absorver e acumular maior quantidade de energia, distribuindo-a pelas restantes estruturas granulares. A organização morfológica verificada na amostra MChL permite também um processo de dissipação mais eficaz da energia acumulada, resultando numa maior capacidade de absorção de radiação e, consequentemente, de fotoprotecção.

A nível estrutural, também o mecanismo de polimerização e grau de polimerização poderão estar igualmente envolvidos numa maior eficiência da absorção da radiação UV-Vis. Enquanto a deslocalização electrónica é facilitada em sistemas onde ocorre uma polimerização direccionada, um maior grau de polimerização poderá promover a estabilidade das espécies radicalares que compõem a estrutura molecular das melaninas. A estabilidade destas espécies é alcançada através da formação de interacções intra e intermoleculares durante o processo de polimerização, as quais produzem alterações ao nível das suas propriedades electrónicas (potencias de ionização e afinidade electrónica) e diminuem a sua reactividade.

Deste modo, um maior grau de polimerização é sinónimo de uma maior estabilidade da estrutura do polímero, propagando as suas propriedades ópticas. Como é visível no espectro de massa, o grau de polimerização da melanina sintética é menor relativamente ao verificado nas melaninas de origem natural (Figura 16), factor que poderá ser responsável pela menor capacidade de absorção da radiação UV-Vis por parte da amostra MCO.

Por último, a composição em metais verificada nas melaninas de origem natural poderá também aumentar o seu carácter fotoprotector, uma vez que estes metais poderão actuar como pontes entre as unidades monoméricas (ou mesmo



oligoméricas) das melaninas, favorecendo a mobilidade electrónica e estendendo a aromaticidade do sistema. Assim, todos estes factores poderão estar na origem do maior carácter fotoprotector evidenciado pelas melaninas de origem natural (não tratadas termicamente) relativamente à melanina sintética (Figura 33).

Quando se procede à análise do comportamento espectroscópico da amostra MChL500\_6H, a situação difere significativamente. A menor quantidade de matéria orgânica e, consequentemente, de estruturas aromáticas presente nesta amostra poderá justificar a menor eficiência de absorção de radiação UV-Vis. Por outro lado, o comportamento espectroscópico obtido para este composto é característico do espectro de melaninas em solução [49]. A fracção de melanina que se dissolve na água corresponde às espécies oligoméricas de menor massa molecular, cuja capacidade de absorção de radiação é muito inferior comparativamente às mesmas unidades polimerizadas. No entanto, esta semelhança entre o espectro de absorção da amostra MChL500\_6H e o de melaninas em solução sustenta uma vez mais o facto de uma unidade fundamental de melanina ainda se poder encontrar presente na estrutura deste composto branco, mesmo após o tratamento térmico aplicado.

Em conclusão, o importante a reter desta análise espectroscópica centra-se no papel da organização estrutural (primária e supramolecular), do grau de agregação e mecanismo de polimerização, nas propriedades ópticas do biopolímero.

Um estudo mais aprofundado da influência destes parâmetros poderá permitir o desenvolvimento das propriedades ópticas das melaninas, perspectivando novas aplicações tecnológicas em áreas que exijam grande eficiência de absorção de energia fotónica.

## 6. Propriedades térmicas

### 6.1 Introdução

Os métodos de análise térmica são frequentemente utilizados na determinação de mudanças de fase que possam ocorrer mediante a exposição de um material a uma fonte de calor, ou na determinação do grau de hidratação de uma amostra [37].

A surpreendente capacidade das melaninas em converter a energia fotônica em calor despertou o interesse no estudo das suas propriedades termofísicas. Numa tentativa de melhor compreender o potencial de absorção, acumulação e dissipação de energia destes biopolímeros, procedeu-se à análise das melaninas por calorimetria diferencial de varrimento.

As propriedades calorimétricas de melaninas são consideradas um tema, até hoje, pouco explorado. Entre os estudos realizados, destaca-se um estudo que envolveu a análise de melaninas de origem natural (olho de boi, cabelo preto de mamíferos, casca de banana) e sintetizadas por autooxidação e enzimaticamente a partir de diferentes substratos (L-Dopa, L-tirosina, tiramina, catecol, adrenalina), no intervalo 290-773 K. Os resultados obtidos salientam a presença de um pico endotérmico no intervalo de temperatura 290-420 K, resultante da perda de água sobre a forma de vapor, e um outro exotérmico entre os 450-700 K, derivado da ocorrência de um fenómeno de transição de fase na estrutura da melanina [50].

Neste trabalho, procedeu-se ao estudo da capacidade de armazenamento de calor de melaninas submetidas a diferentes métodos de secagem (MChL, MChAr, MCh100), utilizando-se a técnica de calorimetria diferencial de varrimento.

O estudo calorimétrico de determinados materiais é essencial para aplicação destes em áreas que envolvam armazenamento e transferência de calor, bem como necessidade de resistência a temperaturas elevadas. Estas aplicações revelam-se extremamente importante a nível tecnológico, na medida em que materiais com maior eficiência no processo de transferência de calor e menos prejudiciais para o ambiente são constantemente procurados, constituindo uma alternativa bastante atraente aos

fluidos correntemente utilizados. A possibilidade de incluir melanina isolada da tinta de choco (um desperdício da pesca, cujo processo de isolamento é bastante simples) neste tipo de aplicações motivou o estudo das suas propriedades térmicas. O valor de densidade publicado para este tipo de melanina ( $1,68 \text{ g/cm}^3$  [19]) permitiu estimar a sua capacidade de armazenamento de calor por unidade de volume. Este parâmetro é frequentemente considerado nos fluidos utilizados em processos de transferência de calor.

A resistência do biopolímero quando exposto a uma fonte de calor foi também testada, estabelecendo-se como temperatura limite os  $500^\circ\text{C}$ . A variação de massa foi registada ao fim de cada tratamento térmico, fornecendo informação acerca da estabilidade do material mediante o aumento de temperatura.

## **6.2 Análise de perda de massa**

### **6.2.1 Descrição e modo de execução**

O polímero foi submetido a diversos tratamentos térmicos e analisado quanto à sua variação de massa. A amostra foi pesada inicialmente, sendo o seu peso novamente controlado no final de cada tratamento térmico. A variação de massa obtida decorrente de cada tratamento térmico permite a obtenção de informação acerca da resistência térmica do material.

**Materiais:** O tratamento térmico foi executado numa mufla Narbatherm Controller P320, tendo-se utilizado um cadinho de alumina como recipiente para a amostra. A balança utilizada nas pesagens das amostras foi uma balança de precisão Metler Toledo AX 205.

**Métodos:** Os procedimentos experimentais para os diversos tratamentos térmicos efectuados encontram-se descritos no subcapítulo 2.2.2 desta tese.

### **6.2.2 Resultados**

Os resultados obtidos do tratamento da amostra MChL nas condições descritas no Aquecimento 1 (subcapítulo 2.2.2) encontram-se representados na Tabela 6.

## Melaninas de origem marinha: Caracterização Química e Termofísica

**Tabela 6** - Perda de massa da melanina MChL ao longo do Aquecimento 1 (subcapítulo 2.2.2). Este tratamento térmico consistiu na realização de vários aquecimentos independentes da mesma amostra às temperaturas de 100, 200, 300, 400 e 500 °C, utilizando-se uma rampa de aquecimento de 20 °C/min e permanecendo 6 horas às referidas temperaturas.

Temperatura (°C)	m <sub>inicial</sub> (g)	m <sub>final</sub> (g)	$\Delta m$ (g)	$\Delta m$ por ensaio (%)	Tempo (h)	Aspecto final	Amostra obtida
100	1,47000	0,74744	-0,72256	49,15	6	Preta	MChL100
200	0,65890	0,53942	-0,11948	18,13	6	Preta	MChL200
300	0,50460	0,27393	-0,23067	45,71	6	Castanha	MChL300
400	0,24111	0,14223	-0,09888	41,01	6	Castanha clara	MChL400
500	0,11950	0,05802	-0,06148	51,44	6	Branca	MChL500_6H

Analisando a tabela anterior, observa-se uma perda de cerca de 90% da massa inicial da melanina até à temperatura de 300 °C, altura em que se começa a observar algumas alterações no seu aspecto físico, nomeadamente ao nível da sua coloração. À temperatura de 500 °C, onde ocorre uma mudança de coloração mais acentuada, a amostra MChL sofre igualmente uma perda de massa bastante elevada.

A influência das condições de aquecimento no grau de decomposição da melanina foi também estudada (Tabela 7).

**Tabela 7** - Perdas de massa obtidas para amostras submetidas a diferentes condições de aquecimento (ponto 2.2.2)

Tipo de tratamento	m <sub>inicial</sub> (g)	m <sub>final</sub> (g)	$\Delta m$ (g)	$\Delta m$ (%)	Aspecto final	Amostra obtida
Aquecimento 2 <sup>a</sup>	0,07282	0,00898	-0,06384	87,66	Branca	MPLB, MChB
Aquecimento 3 <sup>b</sup>	0,64727	0,11075	-0,53652	82,88	Branca acinzentada	MCh24
	0,10180	0,09920	-0,00260	2,55	Branca acinzentada	MCh48
	0,07460	0,07589	+0,00129	1,73	Branca acinzentada	MCh72
Aquecimento 4 <sup>c</sup>	1,49825	0,22969	-1,26856	84,66	Cinzenta	MChL6
	0,20463	0,19367	0,01096	5,36	Cinzenta	MChCinz

**a** - Rampa de temperatura 3 °C/min até 300 °C, patamar de 2 horas, rampa 1 °C/min até 400 °C, patamar 2 horas e rampa idêntica até 500 °C, patamar 4 horas. **b** - Aquecimento independentes da mesma amostra ao longo de 24 horas, 48 horas e 72 horas a 500 °C, utilizando-se uma rampa de aquecimento comum de 20 °C/min. **c** - Aquecimento da melanina até 500 °C, com uma rampa de 20 °C/min e patamar de 6 horas. O tratamento térmico da amostra resultante (MChL6) consistiu no seu aquecimento em condições semelhantes às descritas para o Aquecimento 2.

A tabela anterior demonstra a ocorrência de uma perda acentuada de massa quando a melanina é submetida a um primeiro tratamento térmico. No entanto, um posterior aquecimento da mesma amostra origina uma perda de massa bastante pequena. Tal poderá dever-se a um avançado estado de decomposição atingido pela amostra após o primeiro tratamento térmico ou, alternativamente, a uma possível transição de fase da própria amostra. Através deste tipo de análise, não é possível interpretar em que medida esta pequena perda de massa verificada após um segundo tratamento térmico poderá ser indicativa de resistência térmica do material.

Por outro lado, os resultados obtidos nas Tabelas 6 e 7 evidenciam que o processo de obtenção do composto com coloração branca tem uma cinética bastante lenta, necessitando de um aquecimento prolongado a diversos patamares de temperatura.

### **6.3 Calorimetria diferencial de varrimento**

#### **6.3.1 Descrição e modo de execução**

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) fornece informação acerca da diferença na quantidade de calor necessária para promover um determinado aumento de temperatura na amostra e na referência. Esta grandeza é medida em função da temperatura aplicada [51].

Deste modo, esta técnica permite determinar a capacidade calorífica ( $C_p$ ) de um material. Por capacidade calorífica entende-se a variação térmica que se verifica numa amostra quando sujeita a uma determinada quantidade de calor [51]. A sua capacidade para armazenar calor é avaliada consoante a variação de temperatura registada no material. Deste modo, a medição do parâmetro  $C_p$  do material é traduzida pela seguinte equação:

$$\frac{\frac{q}{t}}{\Delta T} = \frac{q}{\Delta T} = C_p$$

onde  $q/t$  é o fluxo de calor com o tempo, e  $\Delta T/t$  a velocidade de aquecimento.

A quantidade de calor trocada entre a amostra e o ambiente é quantificada por materiais que possuem uma conhecida resistência térmica (termopares). A relação deste parâmetro em função da temperatura permite observar a ocorrência de reacções endotérmicas (direcção positiva eixo y) ou exotérmicas (direcção negativa eixo y), possibilitando a detecção de possíveis mudanças de fase que possam ocorrer na amostra durante o seu processo de aquecimento.

**Materiais:** Neste estudo foram utilizados dois calorímetros Setaram. A amostra MChL foi analisada em cadinhos de alumínio num Setsys Evolution 1.6, enquanto as amostras MCh50 e MCh100 foram analisadas em cadinhos de alumínio num calorímetro TG-DSC 111.

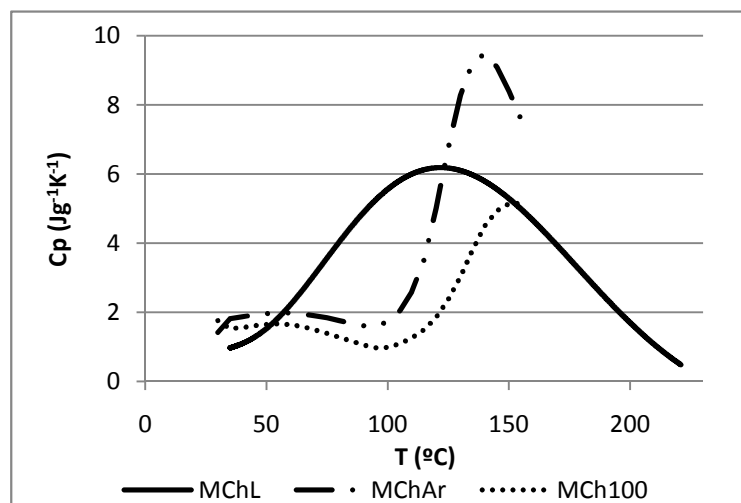
**Métodos:** Na análise da amostra MChL, esta foi submetida a uma isotérmica de 20 °C durante 10 minutos, seguindo-se uma rampa de 5°C/min num intervalo de temperaturas de 20 °C a 220 °C. A análise terminou com uma isotérmica a 220 °C, a pressão constante e sob atmosfera de azoto, tendo-se utilizado aproximadamente 43 mg de amostra na realização da análise.

No que se refere às amostras MCh50 e MCh100, as condições de análise utilizadas envolveram uma isotérmica de 30 °C durante 5 minutos, seguindo-se uma rampa de 2 °C/min ao longo de um intervalo de temperatura de 30 °C a 160 °C, acabando com uma isotérmica a esta última temperatura ao longo de 5 minutos, a pressão constante e em atmosfera de ar. Na realização desta análise, aproximadamente 85 mg de cada uma das duas amostras foram utilizados.

### 6.3.2 Resultados

O estudo do comportamento das melaninas na presença de calor prosseguiu com a análise DSC de amostras submetidas a diferentes processos de secagem: secagem por liofilização (MChL), secagem ao ar (MChAr) e a 100 °C (MCh100). Deste modo, pretendeu-se investigar a influência do grau de hidratação nas propriedades calorimétricas da melanina.

## Melaninas de origem marinha: Caracterização Química e Termofísica



**Figura 34** - DSC melaninas submetidas a diferentes métodos de secagem

As melaninas analisadas revelaram uma capacidade de armazenamento de calor distinta, consoante o método de secagem a que foram sujeitas. Deste modo, a melanina seca por liofilização apresenta um pico bastante largo na zona entre os 62 e 200 °C, apresentando um valor de  $C_p$  de aproximadamente  $6 \text{ kJkg}^{-1}\text{K}^{-1}$ , cerca de 1,5 vezes superior ao da água ( $4 \text{ kJkg}^{-1}\text{K}^{-1}$  [52]). Relativamente às restantes amostras, observa-se um comportamento constante até aos 100 °C, altura em que se inicia a formação de um pico endotérmico que termina a 160 °C, valor que constitui o limite da experiência. A amostra MChAr revela uma capacidade calorífica de cerca  $10 \text{ kJkg}^{-1}\text{K}^{-1}$ .

Uma vez que é conhecido o valor de densidade de melanina isolada da tinta de choco ( $\rho = 1,68 \text{ g/cm}^3$ ), foi possível calcular o  $\rho C_p$  das melaninas analisadas por DSC, estabelecendo-se a comparação com materiais actualmente utilizados como fluidos de transferência de calor (Tabela 8).

**Tabela 8** - Capacidade calorífica  $p/$  unidade de volume das melaninas submetidas a diferentes métodos de secagem

	MChL (100°C)	MChAr (140°C)	MCh100 (140°C)	Ionic liquids (50°C-100°C)	Heat transfer liquids (50°C-150°C)
$\rho C_p / \text{Jcm}^{-3}\text{K}^{-1}$	9.9	15.2	6.7	1.9-2.1	1.5-1.7

Os valores de  $\rho C_p$  obtidos são indicativos da excelente capacidade de armazenamento de calor evidenciada pelas melaninas. Comparativamente aos líquidos iónicos e a outros fluidos de transferência de calor actualmente utilizados (óleos aromáticos, alifáticos e de silicone), as melaninas têm uma capacidade calorífica por unidade de volume cerca de 5 a 8 vezes superior. Como era expectável, as melaninas

secas à temperatura ambiente e a 100 °C têm uma maior capacidade de armazenamento de calor relativamente à melanina liofilizada, provavelmente resultante da maior quantidade de água presente nestas amostras.

#### **2.6.4 Discussão de resultados**

A análise das propriedades termofísicas das melaninas de origem natural (especificamente da tinta de choco) permitiram concluir que se está na presença de um material que revela uma elevada resistência térmica e uma elevada capacidade de armazenamento de calor.

O elevado  $C_p$  registado para as diferentes amostras de melanina poderá estar relacionado com a presença de água na estrutura deste biopolímero. O facto de a unidade fundamental da melanina ser constituída por camadas de oligómeros espaçados por 3.7-4.0 Å permite a presença de moléculas de água (2.8 Å) nos seus interstícios. Desta forma, além de ligações covalentes e forças de Van Der Waals, também pontes de hidrogénio poderão estar envolvidas no suporte da estrutura supramolecular da melanina, proporcionando um material com propriedades únicas.

Deste modo, o grau de hidratação da amostra terá influência no seu valor final de  $C_p$ . Assim, a amostra mais hidratada, MChAr, possui um maior valor de  $C_p$  não só em virtude da quantidade de água que tem adsorvida à superfície, mas também da que se encontra ligada intrinsecamente na sua estrutura. Por conseguinte, a amostra MCh100 possui um menor valor de  $C_p$  resultante de uma menor quantidade de água adsorvida á superfície, em virtude do método de secagem a que foi submetida.

No entanto, os valores de  $C_p$  calculados para as melaninas revelam-se ainda superiores ao da água ( $4 \text{ kJkg}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) [52]. A evaporação da água intersticial e consequente quebra das pontes de hidrogénio entre as camadas de oligómeros que compõem a estrutura da melanina poderá proporcionar uma deslocação dessas camadas e, consequentemente, um crescimento do pico endotérmico que se verifica na zona de evaporação da água (Figura 34). Esta observação poderá indicar que se está em presença de uma possível transição de fase do próprio material, que ocorre num intervalo de temperaturas idêntico ao de vaporização da água. Por outro lado, a



organização estrutural e morfológica do biopolímero poderá também favorecer uma maior acumulação de calor e, conseqüentemente, um aumento da sua capacidade calorífica. A estrutura aromática em forma de folhas sobrepostas (modelo oligomérico) e a morfologia esférica evidenciada por estas melaninas permitem uma acumulação e dissipação de calor mais eficaz.

O cálculo da capacidade de armazenamento de calor por unidade de volume de melanina abriu novos horizontes nas possíveis aplicações deste biopolímero, especialmente na área de transferência de calor. A procura recente de materiais que possam aumentar as propriedades dos fluidos de transferência de calor coloca a melanina na rota destas aplicações. Emulsões destes materiais em líquidos iónicos (ionanofluidos), testadas recentemente com os nanotubos de carbono [53], aumentam a condutividade térmica do fluido e, conseqüentemente, a sua capacidade de transferência de calor. Tendo em conta a sua elevada capacidade de armazenamento de energia, as melaninas poderiam igualmente ser testadas na produção de novos ionanofluidos, na perspectiva de constituírem uma alternativa aos fluidos actualmente utilizados, tanto a nível ambiental como a nível de eficiência. No entanto, para comprovar a eficiência destas emulsões de nanopartículas de melanina, torna-se necessária a realização de estudos de condutividade térmica, os quais se encontram em fase de execução.

Os diferentes intervalos de temperatura onde surge o valor máximo do pico endotérmico de cada amostra possibilitam a escolha da melanina consoante a temperatura a que se pretende trabalhar, de forma a se obter uma máxima eficiência em termos de armazenamento de calor.

Por fim, vale a pena fazer referência à análise de perda de massa do material, uma vez que após um primeiro tratamento térmico até à temperatura de 500 °C, um segundo aquecimento da mesma amostra até uma temperatura idêntica não origina perdas de massa significativas (Tabela 7). A realização de um ensaio termogravimétrico, no qual há um registo contínuo das transformações que ocorrem consoante o aumento de temperatura, constituiria um método mais adequado na tentativa de percepção este comportamento.

## 7. Estudos preliminares como descontaminante de águas residuais

### 7.1 Introdução

A protecção ambiental e a correcção de problemas associados ao meio ambiente constituem questões importantes no que respeita à melhoria da qualidade de vida e a um desenvolvimento sustentável [54]. Para a existência destes problemas ambientais, muito contribuem indústrias da área da petroquímica, síntese química, têxtil, farmacêutica, agroquímica e alimentar, as quais constituem as principais fontes de águas residuais. Actualmente, os processos biológicos são os mais utilizados no tratamento destes efluentes. No entanto, a elevada produção de lamas por parte destes processos, acoplada à existência de poluentes com grande estabilidade química e biológica em águas residuais (difícilmente degradados recorrendo aos habituais processos biológicos) promove a procura de alternativas mais eficazes.

Deste modo, tem-se denotado ultimamente um interesse acrescido em processos de oxidação fotoquímica catalisados por materiais semicondutores, os quais têm revelado um óptimo desempenho na mineralização de uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos [54]. O mecanismo pelo qual este processo de fotodegradação ocorre baseia-se na formação de sítios oxidados em materiais semicondutores por irradiação a um determinado comprimento de onda, os quais poderão seguidamente oxidar um grande número de materiais orgânicos, como corantes, pesticidas e herbicidas [55]. A possibilidade de degradação destes poluentes por um processo que envolve a emissão de luz de um determinado comprimento de onda constitui um avanço importante nos sistemas de descontaminação de águas residuais, perfilando-se como um método eficaz e de baixo custo.

Nos últimos tempos, a capacidade de adsorção de alguns materiais tem também despertado algum interesse no que se refere à descontaminação de águas residuais. A utilização de materiais semicondutores e de elevada área superficial como suporte de fotocatalisadores promove um aumento da eficácia do processo fotocatalítico aplicado à descontaminação de águas residuais.

O facto de a melanina ter propriedades de semicondutor amorfo, aliado ao seu carácter poroso e de nanocompósito, poderá possibilitar a sua utilização em processos de adsorção-fotocatálise. Por outro lado, o carácter não poluente deste material e o baixo custo no seu processo de isolamento de fontes biológicas constituem características favoráveis na sua utilização em processos industriais.

Numa fase preliminar, apenas a capacidade de adsorção de corantes orgânicos pela melanina foi testada. Os resultados satisfatórios obtidos encorajam a continuação de estudos neste campo.

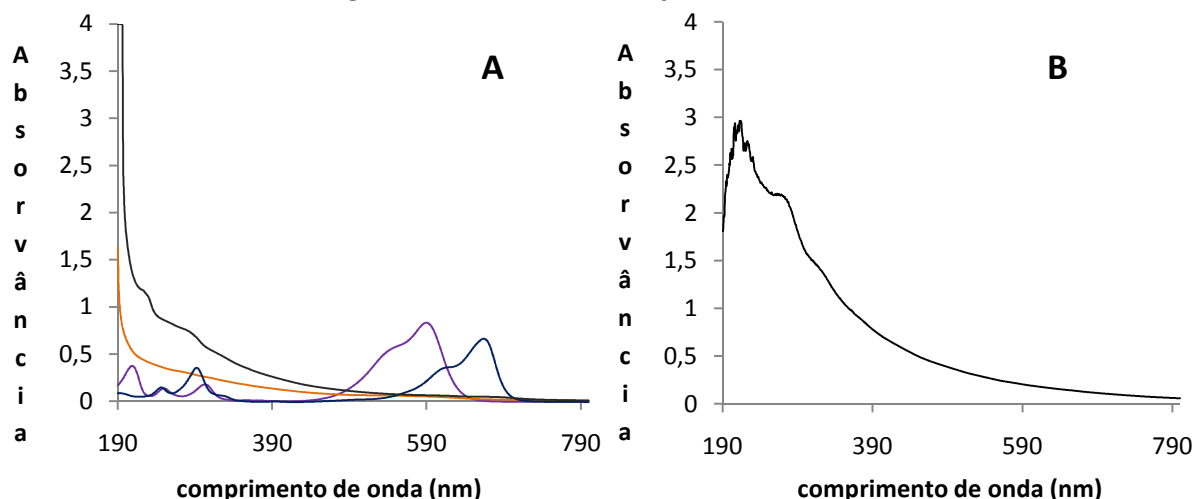
## **7.2 Parte experimental**

Para testar o poder de adsorção da melanina de origem natural, preparou-se uma suspensão de amostra MChL (0,04 g) em 25 mL de solução aquosa de corante (1 mg/L), deixando-se sobre agitação constante durante 1 hora. Seguidamente, a mistura reaccional foi centrifugada (8500 g, 15 min) e o sobrenadante analisado por espectroscopia UV-Vis (Shimadzu UV-1603), no intervalo de comprimento de onda de 800-190 nm. O espectro obtido foi comparado com o espectro de absorção da solução inicial de corante e com o espectro da amostra MChL em solução. Este último espectro foi obtido após agitação da amostra MChL (0,04 g) em 25 mL de água Milli-Q, durante 1 hora. A mistura resultante foi centrifugada (8500 g, 15 min) e o sobrenadante analisado por espectroscopia UV-Vis.

## **7.3 Resultados**

Utilizaram-se soluções aquosas de azul de metileno, violeta de cristal e “naphtol blue black” para testar o poder de adsorção da melanina, tendo em vista a sua aplicação na descoloração de águas residuais contaminadas com este tipo de compostos. A escolha da amostra MChL para realização destes ensaios deve-se ao método de secagem aplicado a esta amostra de melanina, o qual deverá originar um material com maior área superficial em virtude de um menor grau de agregação das nanopartículas.

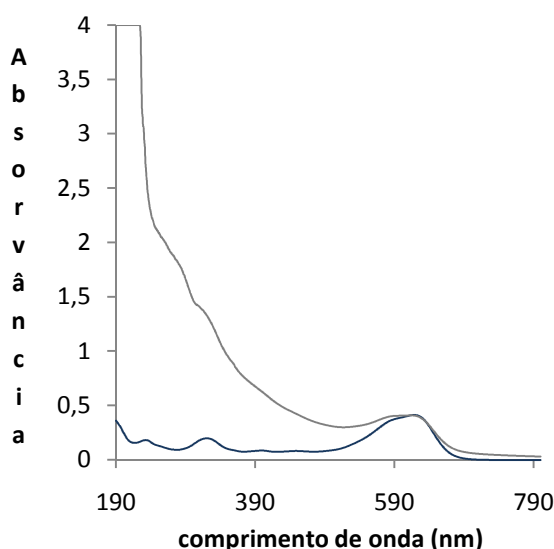
### Melaninas de origem marinha: Caracterização Química e Termofísica



**Figura 35** - Espectros de absorção das soluções de violeta de cristal e azul de metileno antes (roxo e violeta, respectivamente) e após (cinzento e laranja, respectivamente) reacção com a melanina MChL (A); espectro de absorção da melanina em solução (B).

Os espectros UV-Vis da figura 35A demonstram um decréscimo acentuado da absorção na zona dos 595 e 673 nm, correspondentes ao máximo de absorção do violeta de cristal e azul de metileno, respectivamente. Tal facto poderá ser indicativo da ocorrência de adsorção do corante à superfície da melanina, obtendo-se no final da reacção uma solução aproximadamente incolor, com um comportamento espectroscópico idêntico ao da melanina em solução (Figura 35B).

No entanto, quando se testou a amostra MChL com uma solução aquosa do corante “naphtol blue black”, os resultados obtidos divergiram dos observados nos ensaios anteriores.



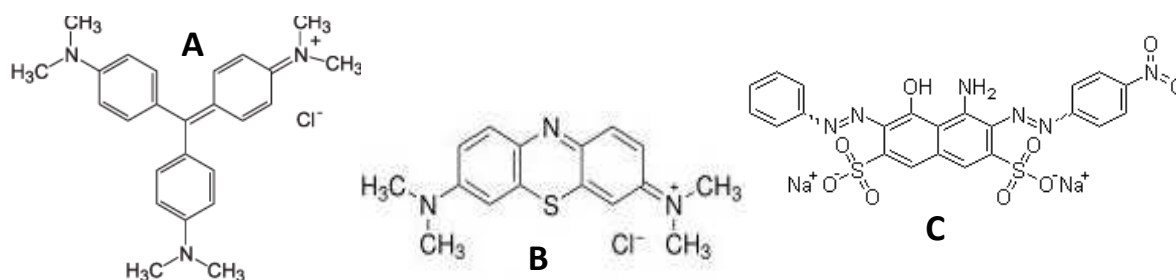
**Figura 36** - Espectros de absorção da solução de “naphtol blue black” antes (azul escuro) e após (cinzento claro) reacção com a melanina (A).

A Figura 36 evidencia a permanência de corante em solução mesmo depois da reacção com a amostra MChL, não ocorrendo a adsorção do corante à superfície da melanina.

## 7.4 Discussão

Ensaio preliminares com melanina extraída da tinta de choco indicam que este composto poderá ser aplicado na descoloração de águas residuais, contaminadas principalmente com corantes catiónicos.

Os testes realizados em dois corantes de carácter catiónico (Figura 35) e um de carácter aniónico (Figura 36) indicam uma maior afinidade dos corantes catiónicos para a superfície da melanina.



**Figura 37** - Estruturas do violeta de cristal (A), azul de metileno (B) e “naphtol blue black” (C)

Esta afinidade encontra-se relacionada com a natureza dos grupos funcionais que se encontram na superfície do biopolímero. A presença de grupos OH, decorrentes das unidades de DHI e DHICA presentes na sua estrutura polimérica, faz com que em solução a melanina adquira uma maior afinidade para compostos catiónicos. A atracção electrostática entre o material semiconductor e o corante, aliada à sua área superficial (não calculada) poderá promover mais uma nova aplicação da melanina, desta vez direccionada para processos ambientais.

No entanto, estudos adicionais no escuro e com luz artificial deverão ser realizados de modo a testar a possibilidade de ocorrência de fotodegradação do corante por parte da melanina. Por outro lado, seria interessante estudar a melanina como suporte de um fotocatalisador bastante utilizado neste tipo de reacções ( $\text{TiO}_2$ ).

A concepção de novos materiais que reúnam propriedades de adsorção e fotodegradação, e cujo processo de síntese/isolamento seja relativamente simples e envolva custos reduzidos, poderá constituir um grande avanço no que se refere à elaboração de processos de descontaminação de águas provenientes do meio industrial, habitualmente causadoras de consideráveis danos ambientais.

## Capítulo III

# Melaninas Sintéticas

## 1. Introdução

Em laboratório, a síntese da melanina foi já conseguida por diversos processos químicos. Estes processos envolvem oxidação do L-DOPA ou tirosina, habituais precursores das melaninas nos organismos vivos. No entanto, outros substratos de partida têm sido igualmente utilizados, entre eles o catecol, dopamina, DHICA, DHI e 5,6 – dihidroxitriptamina [50, 56].

A oxidação via enzimática ou oxidação ao ar (autooxidação) dos substratos anteriormente referidos constituem os principais processos de síntese de melanina correntemente utilizados. No entanto, estes processos apresentam uma cinética bastante lenta e um rendimento consideravelmente reduzido, sendo por esta razão considerados economicamente pouco viáveis. Tal facto reflecte-se no preço de venda da melanina (1 g custa cerca de 402.00 €) [57].

Todos estes factores incentivaram a procura de soluções que tornassem a síntese da melanina um processo mais rápido e económico. O estudo do mecanismo de polimerização e agregação da melanina poderá também contribuir para este objectivo. Este capítulo foca-se essencialmente na procura na de condições de síntese que favoreçam a obtenção de um composto estrutural e morfologicamente idêntico à melanina isolada da tinta de choco.

Nas últimas décadas, vários estudos têm sido realizados acerca da influência das condições de síntese no grau de polimerização e agregação das melaninas. Nestes estudos, parâmetros como o meio utilizado (aquoso ou orgânico) [58], pH, força iónica [59, 60] e efeito de iões metálicos [61] têm sido considerados.

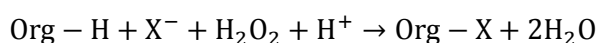
Os resultados obtidos destes estudos sugerem que a síntese em meio aquoso favorece a agregação das melaninas, obtendo-se um material com superfície bastante rugosa. A nível da dimensão granular, a força iónica e o pH desempenham um papel importante, na medida em que um aumento do pH do meio ( $\text{pH} > 8$ ) e um decréscimo da força iónica favorecem a obtenção de partículas de menor dimensão [58]. A influência destes parâmetros no grau de agregação das melaninas encontra-se relacionada com o  $\text{pK}_a$  dos grupos fenólicos (9-13), carboxílicos (4,5) e amina (14) das

unidades que compõem a estrutura da melanina e consequentemente, com o balanço de interacções electrostáticas e densidade de carga que se encontra à superfície das partículas. No que se refere à influência dos metais na síntese das melaninas, sabe-se que a presença de iões metálicos como  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$  poderão alterar as propriedades finais do biopolímero [61].

Assim, com base nestes estudos, procedeu-se neste trabalho à síntese de melaninas em diferentes condições reaccionais, procurando alcançar o objectivo delineado. Inclusive, numa das sínteses realizadas, procedeu-se à adição de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  em concentrações semelhantes às observadas na análise elementar da amostra MChL (Tabela 3), com o intuito de estudar uma possível interferência destes metais no fenómeno de agregação da melanina. Os compostos provenientes destas sínteses foram analisados quanto às suas propriedades estruturais (IV) e morfológicas (SEM), as quais foram comparadas com as observadas nas melaninas de origem natural, estudadas no capítulo II desta tese.

Um segundo objectivo concentrou-se na optimização do processo síntese de melanina, procurando-se aumentar a velocidade de reacção. Actualmente, a produção de melanina numa quantidade considerável poderá demorar desde 3 a 8 dias.

O aumento da velocidade de uma reacção de polimerização pode ser conseguido introduzindo modificações ao nível do substrato, que possam induzir a sua polimerização. Neste caso, a presença de um substituinte que actue como um bom grupo rejeitado pode ser fundamental, pois torna as posições do substrato, onde é mais provável a ocorrência de polimerização, susceptíveis ao ataque nucleófilo. Na natureza, as haloperoxidasas de vanádio constituem um tipo de enzimas capaz de promover este tipo de reacção. Estas enzimas intervêm na oxidação de halogenetos com o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , donde poderá resultar um composto orgânico halogenado caso estejam presentes nucleófilos adequados:



A capacidade de catalisar reacções num sistema em que envolve um substrato orgânico, um halogeneto e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , este último frequentemente utilizado na síntese



enzimática da melanina, despertou o interesse neste tipo de enzimas, cujo centro activo é composto por um peroxocomplexo de vanádio (V).

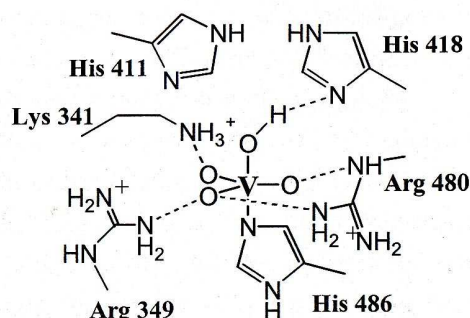


Figura 38 - Centro activo das haloperoxidasas de vanádio

A actividade catalítica de complexos de vanádio em diversas reacções de oxidação, entre as quais reacções de halogenação, sulfoxidação, epoxidação, hidroxilação de alcenos, oxidação de álcoois primários e secundários, não constitui uma novidade [62]. A importância dos peroxocomplexos de vanádio neste tipo de reacções, acoplada ao papel que as haloperoxidasas de vanádio desempenham na natureza conduziram, recentemente, à produção de nanopartículas de  $V_2O_5$  que mimetizam as reacções destas enzimas [62].

Neste trabalho, testou-se a utilização destas nanopartículas em substratos como o L-DOPA (habitual precursor na síntese de eumelanina) na presença de  $H_2O_2$  e KI. Os estudos apresentados nesta dissertação acerca desta reacção são ainda preliminares, englobando apenas o acompanhamento da reacção por espectroscopia UV-Vis e a análise do composto final por espectroscopia IV e SEM. A obtenção de um precipitado preto volumoso ao fim de algumas horas deixou boas indicações acerca do potencial deste sistema reaccional. Uma reacção de síntese de melanina que envolva um procedimento simples, rápido e com bom rendimento constitui um processo economicamente mais viável com vista a uma possível aplicação industrial.

## 2. Parte experimental

As sínteses MS1, MS2 e MS3 foram realizadas num recipiente escuro, de modo a proteger da luz os intermediários formados durante o processo reaccional. O recipiente foi fechado com uma rolha de cortiça com duas aberturas, pelas quais se

fizeram passar dois tubos em L. Estes tubos foram protegidos com prata e tiveram como principal função permitir a circulação de ar comprimido no recipiente, promovendo a autoxidação do substrato. Estas três reacções foram executadas à temperatura ambiente, sob agitação e durante por um período de 8 dias.

## 2.1 Síntese MS1

Para a execução deste processo de síntese de melanina, partiu-se de 200 mL de uma solução 13 mM L-DOPA em tampão borato, à qual se acrescentou NaOH de modo a obter uma concentração de 0,4 M. Esta concentração foi escolhida com base em estudos anteriores, os quais sugerem que esta concentração de sal promove a formação de agregados com uma dimensão próxima à verificada para a melanina extraída da tinta de choco [59]. Neste contexto, a força iónica presente no meio poderá ter um papel fundamental no grau de agregação do composto final. No final da reacção, a mistura reaccional foi centrifugada (8000 g, 10 min) e o “pellet” resultante lavado com água Milli-Q (2 x 10 mL) e seco sobre corrente de azoto.

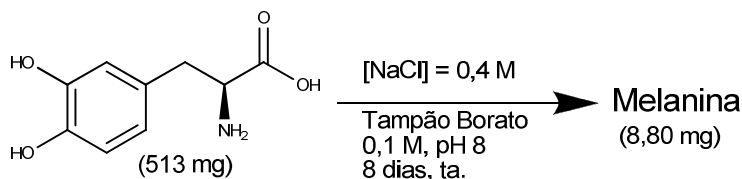


Figura 39 - Esquema reaccional síntese MS1

O tampão borato foi preparado dissolvendo-se 9,0685 g de tetraborato de sódio deca-hidratado ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ) em 500 mL água Milli-Q. O valor de pH foi ajustado a 8 utilizando-se uma solução 0,1 M HCl.

## 2.2 Síntese MS2

Na realização desta síntese, procedeu-se à preparação de uma solução L-DOPA 13 mM em 200 mL de água do mar sintética (Tabela 11). O pH da solução foi ajustado a 8 através da adição de  $NH_4OH$  25%, e a síntese realizada de modo semelhante ao descrito no início da parte experimental.

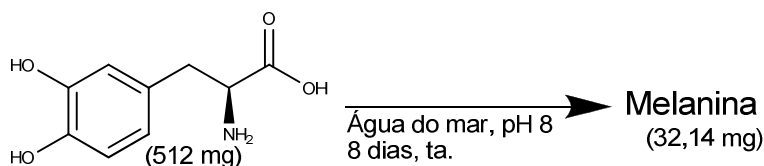


Figura 40 - Esquema reaccional síntese MS2

No final da reacção, a mistura foi centrifugada (8000 g, 10 min) e o “pellet” resultante lavado com água Milli-Q (2 x 10 mL) e seco sobre corrente de azoto. A composição da água do mar sintética encontra-se descrita na Tabela 9 [63].

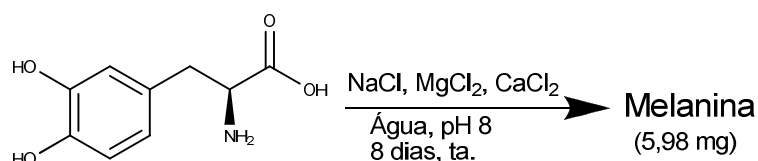
**Tabela 9** - Composição da água do mar sintética (500 mL).

Reagente	Concentração (mol/dm <sup>3</sup> )
NaCl	0,4186
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0596
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0285
KCl	0,0100
CaCl <sub>2</sub>	0,0050

### 2.3 Síntese MS3

Com o intuito de testar a influência da presença de iões metálicos no grau de agregação da melanina, foram adicionados ao meio reaccional metais em quantidades aproximadamente semelhantes às presentes na análise EDS referente à amostra MChL. A quantidade de metais que se deveria adicionar foi calculada tendo em conta que se utilizou 1 mg de melanina na execução da análise SEM-EDS, e com base nos resultados obtidos na referência [44], onde se procede ao estudo da afinidade dos iões Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> para a melanina extraída da tinta de choco. Este estudo concluiu que cerca de 30% de Ca<sup>2+</sup> se complexou à melanina, partindo-se de uma solução inicial 5000 µM CaCl<sub>2</sub>.

Assim, preparou-se uma solução de 13 mM L-DOPA em 200 mL água Milli-Q, à qual se adicionaram 0,0291 g CaCl<sub>2</sub>, 0,073 g MgCl<sub>2</sub> e 0,313 g NaCl. O pH da solução resultante foi ajustado a 8 com NH<sub>4</sub>OH 25% e a reacção realizada em condições idênticas às referidas no início desta parte experimental. No final da reacção, procedeu-se à lavagem do precipitado resultante de forma idêntica à descrita para as duas sínteses anteriores.



**Figura 41** - Esquema reaccional síntese MS3

## 2.4 Síntese MN

Esta reacção foi efectuada numa célula espectrofotométrica de quartzo (3 mL), onde as concentrações finais na célula foram de 1mM L-DOPA, 3,5 mM KI e 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incluindo 30 µL de uma solução 1 mg/mL de nanopartículas V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. O meio reaccional utilizado foi tampão acetato 100 mM, pH 4,0, em virtude de a actividade máxima destas nanopartículas se situar a este valor de pH [62]. A reacção decorreu ao ar e à temperatura de 25 °C, durante um período de 24 h. O precipitado preto obtido foi recuperado por centrifugação (8000 g, 15 min). A mesma reacção executada na ausência de nanopartículas não formou qualquer precipitado preto. Ambas as reacções foram estudadas num espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV-1600), no intervalo de comprimento de onda de 800-190 nm.

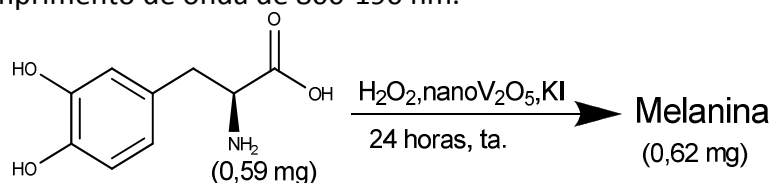


Figura 42 - Esquema reaccional síntese MN

A solução tampão foi preparada dissolvendo-se 1,3608 g de acetato de sódio em 100 mL de água Milli-Q. O pH foi ajustado adicionando-se ácido acético glacial.

## 3. Resultados

### 3.1 Espectroscopia de Infravermelho

As melaninas sintetizadas foram analisadas por espectroscopia IV (Figura 43), estabelecendo-se uma comparação em termos estruturais com uma melanina de origem natural (MChAr), cujo método de secagem foi relativamente semelhante.

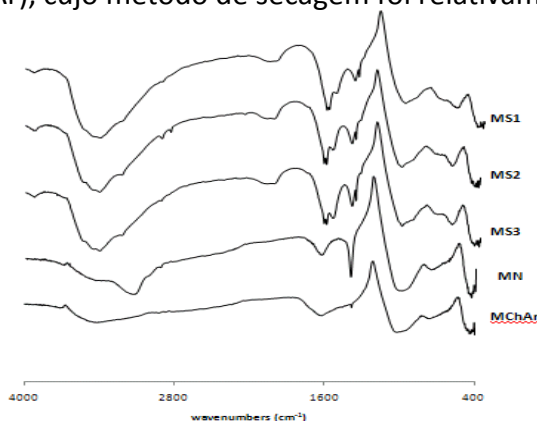


Figura 43 - Espectros IV melaninas sintéticas e melanina de origem natural (amostra MChAr)

## Melaninas de origem marinha: Caracterização Química e Termofísica

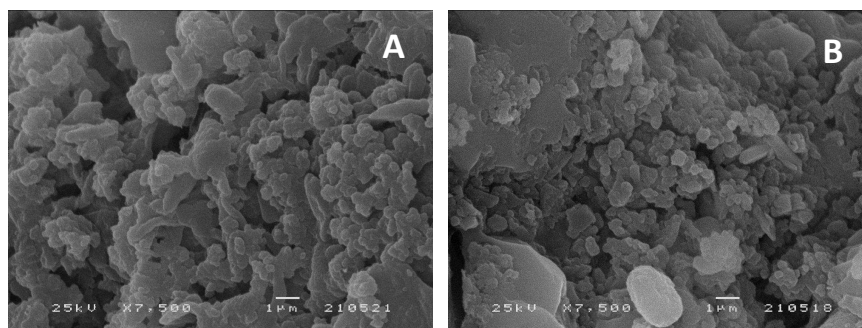
Os espectros IV obtidos indicam alguma semelhança entre os compostos sintetizados e a melanina de origem natural cuja secagem foi efectuada à temperatura ambiente (MChAr).

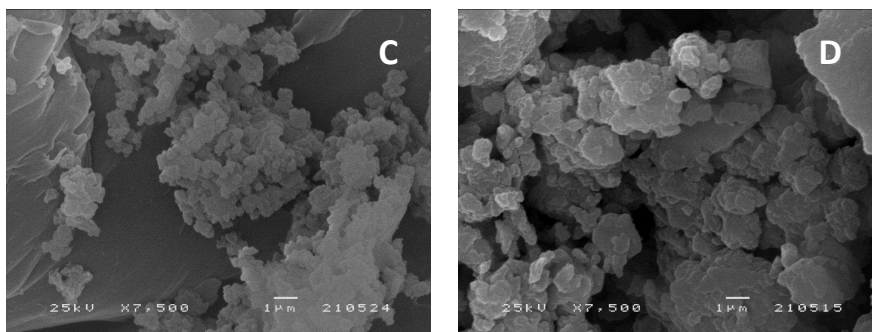
**Tabela 10** - Bandas presentes no espectro IV das melaninas sintetizadas e modos de vibração correspondentes

Amostra	Números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
MS1, MS2, MS3, MN, MChAr	3450-3100	Elongação O-H em fenóis e elongação N-H em amins secundárias
MS1, MS2, MS3	2100-2000	Elongação $\text{C}=\text{N}^+$ (processo de polimerização provavelmente incompleto)
MS1, MS2, MS3, MN, MChAr	1650-1600	Elongação assimétrica $\text{COO}^-$ , elongação $\text{C}=\text{C}$ em aromáticos
MS1, MS2, MS3, MN, MChAr	1400	Elongação C-O-H em fenóis, elongação C-O ou elongação assimétrica em grupos $\text{COOH}$
MS1, MS2, MS3, MN, MChAr	1030-990	Elongação C-N em anéis pirrólicos
MChAr, MN	770-735	Bending C-H para fora do plano em anéis aromáticos orto-substituídos
MS1, MS2, MS3	623	Bending C-H para fora do plano em anéis aromáticos, Bending OH para fora do plano em alcóois

### 3.2 Microscopia Electrónica de Varrimento

Considerando que um dos principais objectivos destas sínteses consistia na obtenção de uma melanina morfologicamente idêntica às melaninas de origem natural extraídas da tinta de choco e polvo, procedeu-se à análise das melaninas sintetizadas recorrendo à técnica de microscopia electrónica de varrimento. As imagens foram adquiridas num microscópio electrónico Jeol JFC 1100.



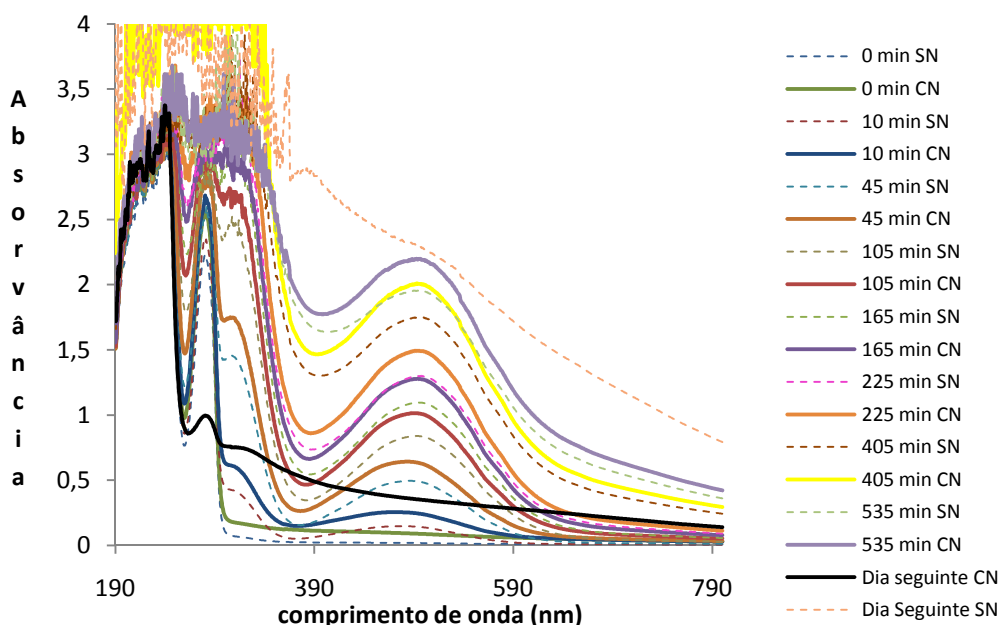


**Figura 44** - Imagens SEM das melaninas sintéticas MS1 (A), MS2 (B), MS3 (C), MN (D)

A análise SEM permitiu concluir que não foi obtida qualquer melanina morfológicamente semelhante à amostra MChAr (Figura 25, capítulo II, ponto 4.2.2). O aspecto morfológico das melaninas sintéticas obtidas aproxima-se bastante do observado para a amostra MCO (Fig.24, capítulo II, ponto 4.2.2), sendo representado por pequenos agregados de forma semi-circular e dimensão não uniforme, cuja superfície não aparenta ter qualquer rugosidade. Particularmente, a amostra MN parece apresentar agregados de superfície mais lisa e forma achatada.

### 3.3. Estudo da reacção MN por espectroscopia UV-Vis

O carácter catalítico das nanopartículas de vanádio na síntese de melanina foi estudado por espectroscopia UV-Vis (Figura 45).



**Figura 45** - Estudo espectroscópico da reacção do L-DOPA com nanopartículas  $V_2O_5$  (CN) e sem nanopartículas (SN)

Na Figura 45 encontra-se representada a evolução espectral da oxidação do L-Dopa catalisada pelas nanopartículas de  $V_2O_5$  e na ausência destas, observando-se a produção de melanina apenas na primeira reacção.

No decorrer da síntese é possível observar, após 10 minutos de reacção, a formação de uma solução de coloração vermelha, caracterizada pelo aparecimento de um pico a 476 nm e um outro a 310 nm, característicos da formação de dopacromo [61]. No entanto, não é de excluir a possibilidade de um destes picos (310 nm) poder ser atribuído à presença do iododopacromo (Figura 46), em virtude da utilização de KI no meio reaccional. O iodo é um bom grupo rejeitado, o que vai facilitar a subsequente reacção de polimerização. Com o decorrer do tempo, observou-se um constante escurecimento da coloração vermelha, caracterizado por um contínuo crescimento da absorvância a 476 nm.

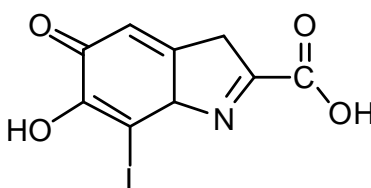


Figura 46 - Representação estrutural do Iododopacromo

No dia seguinte, verificou-se a formação de um precipitado, ficando a solução praticamente incolor. A formação deste precipitado é indicativa do final da reacção, observando-se um decréscimo acentuado na absorvância a 475 nm e a 285 nm, o que indica a conversão quase total do L-DOPA e dos intermediários formados ao longo do processo reaccional.

Torna-se também curioso verificar que após 165 minutos, a velocidade da reacção decresce, independentemente da presença de nanopartículas no meio reaccional.

O crescimento dos picos vulgarmente atribuídos à presença de L-DOPA (241 e 285 nm) ao longo do processo reaccional deverá ser resultado da presença dos vários intermediários formados, entre eles a dopaquinona (272 nm), ciclodopa (280 nm), DHICA (316 nm), DHI (298 nm) [64]. Porém, esta zona de comprimentos de onda não se encontra bem definida no gráfico, em virtude do limite de detecção do aparelho.

Por fim, em virtude do excesso de KI adicionado, poder-se-ão encontrar espécies iodadas no meio reaccional (resultantes da oxidação do  $I^-$ ) após o final a reacção (Figura 47). No decorrer da reacção, observa-se um deslocamento gradual da

banda de 475 nm para 496 nm, provavelmente devido a possíveis interferências resultantes da formação de  $I_2$ , cuja absorção se situa nos 460 nm.

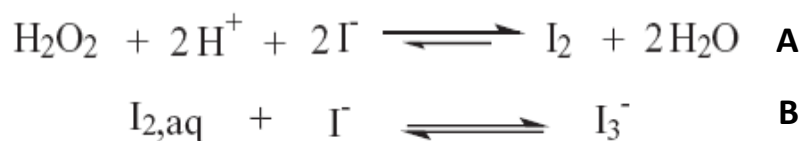


Figura 47 - Reacção de oxidação do Iodeto (A) e formação da espécie  $I_3^-$  (B)

## 4. Discussão de resultados

Os resultados obtidos sugerem que as melaninas sintetizadas possuem um aspecto morfológico semelhante à amostra MCO, o qual é caracterizado por um reduzido grau de agregação e uma superfície granular bastante lisa e porosa, não exibindo a organização e rugosidade verificada na amostra MChAr. A melanina sintetizada utilizando as nanopartículas  $V_2O_5$  parece apresentar uma formação incompleta dos agregados, sendo visíveis estruturas com uma simetria mais achatada, provavelmente em virtude de um menor tempo de reacção relativamente às restantes.

O rendimento de cerca de 4 vezes superior na síntese de melanina em água do mar relativamente às reacções MS1 e MS3 poderá ser resultante de um maior grau de polimerização do biopolímero, decorrente da presença de uma maior quantidade de metais no meio reaccional, realçando a importância das forças electrostáticas no grau de polimerização e agregação da melanina. No entanto, acredita-se as espécies metálicas não deverão ser responsáveis pela morfologia granular esférica e extremamente organizada verificada nas melaninas de origem natural estudadas neste trabalho [65], atendendo ao aspecto morfológico da melanina resultante da síntese MS3.

Com base nos espectros IV, a melanina que se encontra estruturalmente mais próxima da amostra MChAr parece ser a melanina sintetizada na presença de nanopartículas de  $V_2O_5$ , apesar de o seu espectro apresentar um ligeiro desvio, para menores números de onda ( $3150\text{ cm}^{-1}$ ), da banda correspondente à elongação das ligações O-H e N-H. Este desvio poderá ser resultado da participação destes grupos na formação de pontes de hidrogénio. As restantes melaninas (MS1, MS2, MS3)



apresentam bandas adicionais na zona  $2100\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$  e  $620\text{ cm}^{-1}$ , bem como uma maior intensidade e largura da banda a  $3450\text{ cm}^{-1}$ , a qual deverá resultar de um maior grau de hidratação.

O estudo, por espectroscopia UV-Vis, do novo método de síntese de melanina introduzido neste trabalho (reação MN) permitiu constatar que a reação se revela bastante rápida nos primeiros passos reaccionais, que culminam com a formação do dopacromo ou iododopacromo (solução vermelha). A utilização de nanopartículas de  $\text{V}_2\text{O}_5$  acelera este processo, verificando-se um decréscimo da velocidade da reação ao fim de 165 minutos. Esta observação poderá indicar que o catalisador não se regenera na sua totalidade ao longo do processo reaccional, consumindo-se ao fim de um determinado número de ciclos.

Apesar disto, a possibilidade de produção de melanina utilizando nanopartículas de  $\text{V}_2\text{O}_5$  é um método inovador. O estudo de condições reaccionais que conduzam à obtenção de uma reação mais rápida e com um melhor rendimento, deverá constituir um avanço importante na possível adaptação desta reação ao meio industrial. Por outro lado, o estudo do mecanismo reaccional revela-se também fundamental na tentativa de optimização desta reação.

Estudos futuros acerca desta reação incluem identificação dos intermediários formados recorrendo à técnica GC-MS, estudo da cinética envolvida e efeito da variação de cada reagente. O objectivo concentra-se em alcançar as condições reaccionais que permitam a obtenção de melanina num menor período de tempo, e com uma morfologia aproximada às melaninas de origem natural estudadas ao longo deste trabalho.

## Capítulo IV

# **Conclusões e Perspectivas Futuras**

Este trabalho destaca a melanina como um biopolímero de elevada resistência física e térmica, cujas propriedades lhe conferem um amplo leque de aplicações tecnológicas.

As propriedades acrescidas que as melaninas extraídas da tinta do polvo e do choco possuem comparativamente à melanina de origem sintética, nomeadamente ao nível do carácter fotoprotector, acopladas à facilidade de extracção/isolamento potenciam a sua aplicação. Ainda no que se refere às propriedades das melaninas de origem natural estudadas, a semelhança observada entre as duas melaninas deverá ser resultado de um mecanismo de produção de tinta idêntico nos dois organismos.

O aspecto morfológico e estrutural das melaninas de origem natural deverá desempenhar um papel fundamental nas propriedades térmicas destes pigmentos. A presença de estruturas granulares esféricas poderá potenciar a resistência térmica e capacidade de armazenamento de calor verificado nas melaninas, estendendo a sua aplicação a áreas que necessitem de materiais com este tipo de características. A capacidade das melaninas em manter a sua estrutura após tratamento térmico a 400 °C, bem como a provável presença de melanina a 500 °C, evidenciam a resistência deste material. A presença de ligações covalentes e de espécies metálicas no suporte da estrutura polimérica da melanina poderá também justificar estas características.

A obtenção de um composto cristalino a partir de um composto totalmente amorfo não é de todo vulgar nos biopolímeros. O carácter cristalino das amostras tratadas a 500 °C poderá ter influência nas propriedades electrónicas do composto (inicialmente considerado um semiconductor amorfo), pelo que estudos de condutividade e ensaios de fotocorrente deverão ser realizados futuramente.

Neste trabalho, confirmou-se ainda a dificuldade na obtenção de melaninas sintéticas morfológicamente semelhantes às melaninas de origem natural. No entanto, um novo processo de síntese de melanina, por intermédio da oxidação do L-DOPA, foi apresentado. Este método revelou-se mais rápido e eficaz comparativamente aos sistemas de produção de melanina vulgarmente utilizados. Mediante o sucesso da reacção que envolve um sistema  $\text{H}_2\text{O}_2$ , KI e nanopartículas de  $\text{V}_2\text{O}_5$ , seria importante

estudar o seu mecanismo reaccional e o carácter catalítico das nanopartículas, de forma a otimizar este inovador processo de obtenção de melanina.

Na realização deste trabalho, torna-se ainda importante destacar a possibilidade de aplicação da melanina em termos ambientais. Testes preliminares salientam a afinidade deste biopolímero para corantes de natureza catiónica, podendo ser utilizado como descolorante de águas residuais contaminadas com este tipo de poluentes. No entanto, testes adicionais deverão ser realizados neste campo, perspectivando a possível aplicação deste pigmento em processos de adsorção-fotocatálise. Sendo a melanina um material biológico, extremamente insolúvel e de difícil degradação, a sua aplicação nestes processos parece ter bastante viabilidade.

Apesar dos esforços realizados nas últimas décadas, o mecanismo de polimerização e estrutura deste biopolímero continua a ser alvo de grande especulação. Os resultados obtidos nem sempre são concordantes, e a influência da fracção proteica nas propriedades das melaninas continua a ser uma incógnita, bem como as condições de síntese *in vivo*.

A relação da composição estrutural e mecanismo de polimerização das melaninas com as suas inúmeras propriedades abre novos horizontes nas aplicações tecnológicas destes materiais, que se começam a perfilar como super-biopolímeros, em consequência do seu carácter multi-funcional.

## Bibliografia

- [1] – Hanlon RT, Messenger JB. Cephalopod Behaviour. Cambridge University Press, Cambridge, UK; 1996.
- [2] – Wood JB, Pennoyer KE, Derby CD. Ink is a conspecific alarm cue in the Caribbean reef squid, *Sepioteuthis sepioidea*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 2008; **367**: 11-16.
- [3] – Boyle P, Rodhouse P. Cephalopods: Ecology and Fisheries. Blackwell Publishing, Oxford, UK; 2005.
- [4] – Scott G. Essential animal behavior. Blackwell Publishing, Oxford, UK; 2005.
- [5] – The Cephalopod page [Internet] Disponível em [www.thecephalopodpage.org](http://www.thecephalopodpage.org) a [20 Julho 2010].
- [6] – Fiore D, Poli A, Di Cosmo A, d'Ischia M, Palumbo A. Dopamine in the ink defence system of *Sepia officinalis*: biosynthesis, vesicular compartmentation in mature ink gland cells, nitric oxide (NO)/cGMP-induced depletion and fate secreted ink. Journal of Biochemistry 2004; **378**: 785-791.
- [7] – Girod P. Tese : Recherches sur la poche du noir des Céphalopodes des côtes de France. Faculté des Sciences de Paris (1881).
- [8] – Ito S. A chemist's view of melanogenesis. Pigment Cell Research 2003; **16**: 230 – 236.
- [9] – Schraermeyer U. Fine structure of melanogenesis in the ink sac of *Sepia officinalis*. Pigment Cell & Melanoma Research 1994; **7**: 52-60.
- [10] – Meredith P, Powell BJ, Riesz J, Nighswander-Rempel SP, Pederson M, Moore EG. Towards structure-property-function relationships for eumelanin. Soft Matter 2006; **2**: 37-44.
- [11] – Capozzi V, Perna G, Carmone P, Gallone A, Lastella M, Mezzenga E, Quartucci G, Ambrico M, Augelli V, Biagi PF, Ligonzo T, Minafra A, Schiavulli L, Pallara M, Cicero R.

Optical and photoelectronic properties of melanin. *Thin Solid Films* 2006; **511-512**: 362-366.

[12] – Bandaranayake WM. The nature and role of pigments in invertebrates. *Natural Products Reports* 2006; **23**: 223-255.

[13] – Henson JM, Butler MJ, Day AW. The dark side of the Mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annual Reviews in Phytopathology* 1999; **37**: 447-471.

[14] – Riley PA. Molecules in focus – Melanin. *International Journal Biochemistry Cell Biology* 1997; **29**: 1235-1239.

[15] – Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology* 2000; **3**: 354-358.

[16] – Blois MS, Zahlan AB, Maling JE. Electron Spin Resonance studies on melanins. *Biophysical Journal* 1964; **4**: 471-490.

[17] – Jastrzebska M, Kocot A, Vij JK, Zalewska-Rejdak J, Witecki T. Dielectric studies on charge hopping in melanin polymer. *Journal of Molecular Structure* 2002; **606**: 205-210.

[18] – Plonka PM, Grabacka M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects. *Acta Biochimica Polonica* 2006; **53**: 429-443.

[19] - Liu Y, Simon JD. The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from the ink sac of *Sepia officinalis*. *Pigment Cell Research* 2003, **16**: 72-80.

[20] - Liu Y, Simon JD. Isolation and biophysical studies of natural eumelanins: applications of imaging technologies and ultrafast spectroscopy. *Pigment Cell Research* 2003, **16**: 606-618.

[21] – d’Ischia M, Napolitano A, Pezzella A, Meredith P, Sarna T. Chemical and structural diversity in eumelanins: unexplored bio-optoelectronic materials. *Angewandte Chemie International Edition* 2009; **48**: 3914-3921.

- [22] – Powell BJ. 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid: a first principles density functional study. *Chemical Physics Letters* 2005; **402**: 111-115.
- [23] – Meng S, Kaxiras E. Theoretical models of eumelanin protomolecules and their optical properties. *Biophysical Journal* 2008; **94**: 2095-2105.
- [24] - Raper HS, The tyrosinase-tyrosine reaction: Production from tyrosine of 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid - the precursors of melanin. *Journal of Biochemistry* 1927; **21**: 89 – 96.
- [25] – Liu Y, Kempf VR, Nofsinger JB, Rudnicki M, Wakamatsu K, Ito S, Simon JD. Comparison of structural and physical properties of human hair melanin following enzymatic or acid-base extraction. *Pigment Cell Research* 2003; **16**: 355-365.
- [26] - Sarna T, Meredith P. The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment Cell Research* 2006; **19**: 572-594.
- [27] – Nakamura A, Arimoto M, Takeuchi K, Fujii T. A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2002; **25**: 569-572.
- [28] - Novellino L, Napolitano A, Prota G. Isolation and characterization of mammalian eumelanins from hair and irides. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; **1475**: 295-306.
- [29] - Müller WEG, Boreiko A, Schlobmacher U, Wang X, Eckert C, Kropf K, Li J, Schröder HC. Identification of a silicatein(-related) protease in the giant spicules of the deep-sea hexactinellid *Monorhaphis chuni*. *The Journal of Experimental Biology* 2007; **211**: 300-309.
- [30] - Müller WEG, Schlobmacher U, Eckert C, Krasko A, Boreiko A, Ushijima H, Wolf SE, Tremel W, Müller IM, Schröder HC. Analysis of the axial filament in spicules of the demosponge *Geodia cydonium*: Different silicatein composition in microscleres (asters) and megascleres (oxeas and triaenes). *European Journal of Cell Biology* 2007; **86**: 473-487.

- [31] – Zaia DAM, Zaia CTBV, Lichtig J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens das técnicas existentes. *Química Nova* 1998; **21**: 787-793.
- [32] – Pezzella A, d'Ischia M, Napolitano A, Palumbo A, Prota G. An integrated approach to the structure of sepia melanin. Evidence for a high proportion of degraded 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid units in the pigment backbone. *Tetrahedron* 1997; **53**: 8281-8286.
- [33] – Napolitano A, Pezzella A, Vincensi MR, Prota G. Oxidative degradation of melanins to pyrrole acids: a model study. *Tetrahedron* 1995; **51**: 5913-5920.
- [34] – Pezzella A, Napolitano A, d'Ischia M, Prota G. Oxidative polymerization of 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin: a new insight *Tetrahedron* 1996; **52**: 7913-7920.
- [35] – Gauglitz G, Vo-Dinh T. *Handbook of Spectroscopy*. Vol. **1**, Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany; 2003.
- [36] – Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. *Introduction to Spectroscopy*. 4<sup>th</sup> edition, Books/Cole Cengage Learning, California, USA; 2009.
- [37] – Dann SE. *Reactions and characterization of solids*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK; 2000.
- [38] – Pezzella A, Napolitano A, d'Ischia M, Prota G, Seraglia R, Traldi P. Identification of partially degraded oligomers of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid in *sepia* melanin by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1997; **11**: 368-372.
- [39] – Moses DN, Harreld JH, Stucky GD, Walte JH. Melanin and *Glycera* Jaws – Emerging dark side of a robust biocomposite structure. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; **281**: 34826-34832.
- [40] – JCPDS-ICDD International Center for Diffraction Data, Powder Diffraction File Alphabetical Index, Swarthmore, PA, 1988 1988, File 5-586.



- [41] – Stainsack J, Mangrich AS, Maia CMBF, Machado VG, dos Santos JCP, Nakagaki S. Spectroscopic investigation of hard and soft metal binding sites in synthetic melanin *Inorganica Chimica Acta* 2003; **356**: 243-248.
- [42] – Senesi N, Miano TM, Martin JP. Elemental, functional infrared and free radical characterization of humic acid-type fungal polymers (melanins) *Biology and Fertility of Soils* 1987; **5**: 120-125.
- [43] – Watt AAR, Bothma JP, Meredith P. The supramolecular structure of melanin. *Soft Matter* 2009; **5**: 3754–3760.
- [44] – Liu Y, Hong L, Kempf VR, Wakamatsu K, Ito S, Simon JD. Ion-exchange and adsorption of Fe(III) by *Sepia* melanin. *Pigment Cell Research* 2004; **17**: 262-269.
- [45] – Gallas JM, Littrell KC, Seifert S, Zajac GW, Thiyagarajan P. Solution structure of copper ion-induced molecular aggregates of tyrosine melanin. *Biophysical Journal* 1999 ; **77**: 1135-1142.
- [46] – Cheng J, Moss SC, Eisner M. X-ray characterization of melanins – II. *Pigment Cell Research* 1994 ; **7** : 263-273.
- [47] – Amelinckx S, van Dyck D, van Landuyt J, van Tendeloo G. *Handbook of microscopy: Applications in materials science, solid-state physics and chemistry*. VCH, Weinheim, Germany; 1997.
- [48] – Schmitz I, Schreiner M, Friedbacher G, Grasserbauer M. Tapping-Mode AFM in comparison to contact-mode AFM as a tool for *in situ* investigations of surface reactions with reference to glass corrosion. *Analytical Chemistry* 1997; **69**: 1012-1018.
- [49] – Davidenko SA, Kurik MV, Piryantinskii YP, Verbitski AB. Studies of melanin pigments from different origin. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 2005; **426**: 37-45.
- [50] – Simonovic B, Vucelic V, Hadzi-Pavlovic A, Stepien K, Wilczok T, Vucelic D. Thermogravimetry and differential scanning calorimetry of natural and synthetic melanins. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 1990; **36**: 2475-2482.

- [51] – Haines PJ. Principles of thermal analysis and calorimetry. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK; 2002.
- [52] – Nakayama H, Aida K. The measurement of the heat capacity differences due to the change of water structure in aqueous solutions of organic compounds. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 1999; **56**: 1367-1373.
- [53] – Nieto de Castro, CA, Lourenço, MJV, Ribeiro, APC, Langa, E, Vieira, SIC, Goodrich, P, Hardacre, C. Thermal Properties of Ionic Liquids and IoNanofluids of Imidazolium and Pyrrolidinium Liquids. Journal of Chemical & Engineering Data 2010; **55**: 653-661.
- [54] – Silva, CG. Desenvolvimento de materiais para a descontaminação fotocatalítica de águas. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química 2010; **118**: 31-34.
- [55] – Albuquerque R, Neves MC, Mendonça MH, Trindade T, Monteiro O. Adsorption and catalytic properties of SiO<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub> nanocomposites on the methylene blue photodecolorization process. Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects 2008; **328**: 107-113.
- [56] – Allegri G, Bertazzo A, Costa C, Seraglia R, Traldi P. Investigation on melanin biosynthesis from 5,6-Dihydroxytryptamine by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 1996; **10**: 419-423.
- [57] – Sigma Aldrich *Homepage* [Internet] Disponível em [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) a [15 Agosto 2010].
- [58] – Lorite GS, Coluci VR, da Silva MIN, Dezidério SN, Graef CFO, Galvão DS, Cotta MA. Synthetic melanin films: Assembling mechanisms, scaling behavior and structural properties. Journal of Applied Physics 2006; **99**: 113511-113516.
- [59] – Bridelli MG. Self-assembly of melanin studied by laser light scattering. Biophysical Chemistry 1998; **73**: 227-239.

- [60] – Huang JS, Sung J, Elsner M, Moss SC, Gallas J. The fractal structure and the dynamics of aggregation of synthetic melanin in low pH aqueous solutions. *Journal of Chemical Physics* 1989; **90**: 25-29.
- [61] – Chodurek E, Pilawa B, Dzierzega-Leczna A, Kurkiewicz S, Swiatkowska L, Wilezok T. Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions on DOPA-melanin structure analyzed by pyrolysis-gas chromatography mass spectrometry and EPR spectroscopy. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2003; **70**: 43-54.
- [62] – André R, Natálio F, Humanes M, Weyer R, Müller WEG, Tremel W.  $\text{V}_2\text{O}_5$  nanowires with an intrinsic peroxidase like activity. Aceite recentemente para publicação no jornal *Advanced Functional Materials*.
- [62] – Scheuer PJ. *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives*. Academic Press, New York, USA; 1981.
- [64] – Robinson GM, Smyth MR. Simultaneous determination of products and intermediates of L-Dopa oxidation using capillary electrophoresis with diode-array detection. *Analyst* 1997; **122**: 791-802.
- [65] – Liu Y, Simon JD. Metal-ion interactions and structural organization of Sepia eumelanin. *Pigment Cell Research* 2005; **18**: 42-48.
- [66] – Galvão DS, Caldas MJ. Theoretical investigation of model polymers for eumelanins II. Isolated defects. *Journal of Chemical Physics* 1990; **93**: 2848-2853.
- [67] – SpecialChem *Homepage* [Internet] Disponível em [www.specialchem4adhesives.com](http://www.specialchem4adhesives.com) a [31 Julho 2010].
- [68] – [Internet] Disponível em [http://1.bp.blogspot.com/\\_GqoVHUf2z3c/SpxlIDjW7FI/AAAAAAAAAMI/FIt1vA8wHkl/s1600-h/octopus+ink.jpg](http://1.bp.blogspot.com/_GqoVHUf2z3c/SpxlIDjW7FI/AAAAAAAAAMI/FIt1vA8wHkl/s1600-h/octopus+ink.jpg) a [29 Julho 2010].

# Anexos

## Anexo I

### Resultados da análise por difracção de raios-X

**Tabela A.** Parâmetros dos picos registados nos difractogramas das amostras de melanina de origem natural distinta após o seu tratamento térmico (Aquecimento 2). Os picos comuns entre as diversas amostras analisadas (representadas nas Tabelas A, B e C) encontram-se marcados. **Legenda:** Cinzento – Comuns a 2 ou 3 amostras. Verde – Comuns a 5 amostras. Azul – Comuns a todas as amostras. Amarelo – Picos referentes ao  $\text{CaCO}_3$  na forma de calcite

MChB			MPLB		
Ângulo $2\theta$ (°)	Espaçamento d (Å)	Intensidade Relativa (%)	Ângulo $2\theta$ (°)	Espaçamento d (Å)	Intensidade Relativa (%)
----	----	----	14,045	6,3006	3,5
21,049	4,0479	2,9	20,295	4,3722	1,1
23,195	3,8431	8,3	23,095	3,8480	10,6
25,430	3,4997	2,9	----	----	----
29,355	3,0401	100,0	----	----	----
29,460	3,0295	93,3	29,410	3,0346	100,0
30,510	2,9276	8,3	----	----	----
31,605	2,8286	13,1	32,015	2,7933	5,5
36,020	2,4914	12,3	36,025	2,4911	9,0
39,440	2,2829	13,1	39,425	2,2837	14,9
42,780	2,1121	22,0	42,855	2,1085	18,2
43,270	2,0893	22,0	43,245	2,0904	16,1
44,555	2,0320	4,9	----	----	----
47,465	1,9139	12,3	47,530	1,9115	9,9
48,515	1,8749	11,5	48,495	1,8757	11,9

## Melaninas de origem marinha: Caracterização Química e Termofísica

**Tabela B.** Parâmetros dos picos registados nos difractogramas das amostras de melaninas da mesma origem submetidas a diferentes condições de aquecimento. Os picos comuns entre as diversas amostras analisadas (representadas nas Tabelas A, B e C) encontram-se marcados. **Legenda:** Cinzento – Comuns a 2 ou 3 amostras. Verde – Comuns a 5 amostras. Azul – Comuns a todas as amostras. Amarelo – Picos referentes ao  $\text{CaCO}_3$  na forma de calcite

MChL6 / MCh6H_500						MCh500_24 / MCh500_72					
Ângulo 2θ (°)		Espaçamento d (Å)		Intensidade Relativa (%)		Ângulo 2θ (°)		Espaçamento d (Å)		Intensidade Relativa (%)	
10,705		8,2577		12,2							
13,945	13,630	6,3455	6,4914	16,0	7,8	13,680	13,685	6,4678	6,4655	4,6	1,5
20,375	20,335	4,3552	4,3637	15,3	23,8	20,350	20,390	4,3605	4,3520	9,2	3,6
23,020	23,135	3,8604	3,8415	5,1	16,9	23,730	23,855	3,7465	3,7271	0,6	0,7
----	----	----	----		----	24,580	----	3,6188	----	0,9	----
----	25,300	----	3,5174		9,6	25,690	----	3,4649	----	0,7	----
27,410	27,530	3,2513	3,2374	11,7	4,9	27,400	27,405	3,2524	3,2519	9,8	9,0
----	28,960	----	3,0807		21,9	----	----	----	----	----	----
29,460	29,480	3,0295	3,0275	27,6	100	29,020	29,320	3,0744	3,0437	6,6	2, 6
31,720	32,195	2,8186	2,7781	100	9,2	31,700	31,695	2,8204	2,8208	100,0	1,0
----	----	----	----		----	----	33,250	----	2,6924	----	100,0
----	34,155	----	2,6231		11,3	34,395	34,750	2,6053	2,5795	3,3	2,0
35,610	35,605	2,5191	2,5195	14,1	18,0	35,655	35,620	2,5154	2,5185	10,0	3,1
----	36,155	----	2,4824		9,2	36,980	----	2,4289	----	0,8	----
----	39,465	----	2,1822		16,4	----	----	----	----	----	----
----	41,340	----	2,2815		8,1	41,325	41,410	2,1830	2,1787	2,9	0,7
42,865	42,815	2,1081	2,1104	11,7	23,1	42,940	43,010	2,1046	2,1013	6,4	2,4
----	43,305	----	2,0877		25,0	43,765	43,890	2,0668	2,0612	4,3	1,2
45,395	----	1,9963	----	46,7	----	45,415	45,400	1,9955	1,9961	37,6	33,1
----	----	----	----		----	45,605	----	1,9876	----	17,3	----
----	----	----	----		----	46,690	----	1,9439	----	1,5	----
----	47,640	----	1,9073		13,9	----	----	----	----	----	----
----	48,610	----	1,8715		19,6	----	----	----	----	----	----

## Melaninas de origem marinha: Caracterização Química e Termofísica

**Tabela C.** Parâmetros dos picos registados no difractograma correspondente à amostra MChCinz. Os picos comuns entre as diversas amostras analisadas (representadas nas Tabelas A, B e C) encontram-se marcados. **Legenda:**

**Cinzentos** – Comuns a 2 ou 3 amostras. **Verdes** – Comuns a 5 amostras. **Azuis** – Comuns a todas as amostras. **Amarelos**

– Picos referentes ao  $\text{CaCO}_3$  na forma de calcite

MChCinz		
Ângulo $2\theta$ (°)	Espaçamento d (Å)	Intensidade Relativa (%)
13,980	6,3297	11,2
17,500	5,0637	1,1
20,390	4,3520	15,7
23,020	3,8604	5,1
25,080	3,5478	1,5
27,410	3,2513	10,9
28,050	3,1785	4,0
29,445	3,0310	25,9
31,700	2,8204	100
33,900	2,6422	2,1
34,870	2,5709	1,8
35,535	2,5243	11,8
39,460	2,2818	2,2
41,385	2,1800	5,1
42,865	2,1081	14,0
43,885	2,0614	6,4
45,415	1,9955	35,0
47,530	1,9115	2,7
48,500	1,8755	2,9

## Anexo II

### File 5-586 (Calcite)

5-0586 MINOR CORRECTION


d	3.04	2.29	2.10	3.86	CaCO <sub>3</sub>									
I/I <sub>1</sub>	100	18	18	12	CALCIUM CARBONATE	(CALCITE)								
Rad. CuKα <sub>1</sub>	λ 1.5405	Filter Ni	d Å			I/I <sub>1</sub>	hkl	d Å	I/I <sub>1</sub>	hkl				
Dia.	Cut off	Coll.				3.86	12	102	1.297	2	218			
I/I <sub>1</sub>	G.C. DIFFRACTOMETER	d corr. abs.?				3.035	100	104	1.284	1	306			
Ref. SWANSON AND FUYAT, NBS CIRCULAR 539, VOL. II, 51 (1953)						2.845	3	006	1.247	1	220			
						2.495	14	110	1.235	2	1.1.12			
					2.285	18	113	1.1795	3	2.1.10				
Sys. HEXAGONAL	S.G. D <sub>3d</sub> - R $\bar{3}$ c													
a <sub>0</sub> 4.989	b <sub>0</sub>	c <sub>0</sub> 17.062	A	C 3.420	2.095	18	202	1.1538	3	314				
α	β	γ	Z 6		1.927	5	204	1.1425	1	226				
Ref. l b i d.					1.913	17	108	1.1244	<1	2.1.11				
					1.875	17	116	1.0613	1	2.0.14				
					1.626	4	211	1.0473	3	404				
δ α	n <sub>D</sub> 1.659	ε γ 1.487	Sign -											
2V	D <sub>x</sub> 2.711mp	Color												
Ref. l b i d.					1.604	8	212	1.0447	4	138				
					1.587	2	1.0.10	1.0352	2	0.1.15				
					1.525	5	214			1.1.15				
SAMPLE FROM MALLINCKRODT CHEM. WORKS. SPECT.					1.518	4	208	1.0234	<1	1.2.13				
ANAL.: <0.1% SR; <0.01% BA; <0.001% AL, B, CS,					1.510	3	119	1.0118	2	3.0.12				
CU, K, MG, NA, SI, SN; <0.0001% AG, CR, FE, LI, MN.					1.473	2	215	0.9895	<1	231				
X-RAY PATTERN AT 26°C					1.440	5	300	.9846	1	322				
					1.422	3	0.0.12	.9782	1	1.0.17				
REPLACES 1-0837, 2-0623, 2-0629, 3-0569, 3-0593,					1.356	1	217	.9767	3	2.1.14				
3-0596, 3-0612, 4-0636, 4-0637					1.339	2	2.0.10	.9655	2	234				

Figura I. File correspondente ao CaCO<sub>3</sub> na forma de Calcite<sup>[40]</sup>



## Anexo III

### Reagentes

Designação	Marca	Grau de Pureza	Simbologia de riscos e segurança
Acetato de Etilo	Carlo Erba	Pa.	R11, 36, 66, 67; S16, 26, 33
Acetato de sódio tri-hidratado	Riedel-de Haën	>99,5	-----
Acetona	Merck	>99,5	R11, 36, 66, 67; S9, 16, 26, 46
Ácido acético glacial	Carlo Erba	>99,7	R10, 35; S23, 36, 45
Ácido clorídrico	Merck	37%	R34, 37; S26, 45
Ácido sulfúrico	Riedel-de Haën	98%	R35; S26, 30, 45
Brometo de potássio	Merck	>99,5	R36/37/38; S26, 36
Cloreto de cálcio	Riedel-de Haën	>98	R36; S22, 24
Cloreto de magnésio	Riedel-de Haën	>99	-----
Cloreto de Sódio	Panreac	>99,5	-----
Diclorometano	Merck	99,8	R40; S23, 24/25, 36/37
DL-ditiotreitol	Sigma	98	R22, 36/37/38; S26, 36
Etanol	Panreac	>99,7	R11; S7, 16
Hidróxido de sódio	Merck	>99	R35; S26, 37/39, 45
Iodeto de potássio	Sigma	>99,5	-----
L-dopa	Alfa Aesar	98	R22, 36/37/38; S26, 36
Metanol	Panreac	>99,8	R11, 23/24/25, 39/23/24/25; S7, 16, 36/37, 45
Peróxido de hidrogénio	Panreac	30	R22, 41; S26, 39
Proteinase K	Sigma	-----	R36/37/38, R42 S22, 24, 26, 36/37
Tetraborato de Sódio deca-hidratado	Sigma	>99,5	R60, 61; S53, 45
Reagente de Bradford	Sigma	----	R34-20/21/22-68/20/21/22 S26-36/37/39-45

## Anexo IV

### **Frases de risco e segurança**

## Lista de frases de risco e segurança usadas com substâncias perigosas

As frases seguintes foram adoptadas pela directiva do Conselho da Comunidade Europeia 67/548/EC e pela Portaria n.º 732-A/96

### SÍMBOLOS E INDICAÇÕES DE PERIGO DAS SUBSTÂNCIAS E PREPARAÇÕES PERIGOSAS

Natureza dos riscos específicos atribuídos às substâncias e preparações perigosas:

- R 1 Explosivo no estado seco.
- R 2 Risco de explosão por choque, fricção, fogo ou outras fontes de ignição.
- R 3 Grande risco de explosão por choque, fricção, fogo ou outras fontes de ignição.
- R 4 Forma compostos metálicos explosivos muito sensíveis.
- R 5 Perigo de explosão sob a acção do calor.
- R 6 Perigo de explosão com ou sem contacto com o ar.
- R 7 Pode provocar incêndio.
- R 8 Favorece a inflamação de matérias combustíveis.
- R 9 Pode explodir quando misturado com matérias combustíveis.
- R 10 Inflamável.
- R 11 Facilmente inflamável.
- R 12 Extremamente inflamável.
- R 14 Reage violentamente em contacto com a água.
- R 15 Em contacto com a água liberta gases extremamente inflamáveis.
- R 16 Explosivo quando misturado com substâncias comburentes.
- R 17 Espontaneamente inflamável ao ar.
- R 18 Pode formar mistura vapor-ar explosiva/inflamável durante a utilização.
- R 19 Pode formar peróxidos explosivos.
- R 20 Nocivo por inalação.
- R 21 Nocivo em contacto com a pele.
- R 22 Nocivo por ingestão.
- R 23 Tóxico por inalação.
- R 24 Tóxico em contacto com a pele.
- R 25 Tóxico por ingestão.
- R 26 Muito tóxico por inalação.
- R 27 Muito tóxico em contacto com a pele.
- R 28 Muito tóxico por ingestão.
- R 29 Em contacto com a água liberta gases tóxicos.
- R 30 Pode-se tornar facilmente inflamável durante o uso.
- R 31 Em contacto com ácidos liberta gases tóxicos.
- R 32 Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.
- R 33 Perigo de efeitos cumulativos.
- R 34 Provoca queimaduras.
- R 35 Provoca queimaduras graves.
- R 36 Irritante para os olhos.
- R 37 Irritante para as vias respiratórias.
- R 38 Irritante para a pele.
- R 39 Perigos de efeitos irreversíveis muito graves.
- R 40 Possibilidades de efeitos irreversíveis.
- R 41 Risco de graves lesões oculares.
- R 42 Pode causar sensibilização por inalação.
- R 43 Pode causar sensibilização em contacto com a pele.
- R 44 Risco de explosão se aquecido em ambiente fechado.
- R 45 Pode causar cancro.
- R 46 Pode causar alterações genéticas hereditárias.
- R 48 Riscos de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada.
- R 49 Pode causar cancro por inalação.
- R 50 Muito tóxico para os organismos aquáticos.
- R 51 Tóxico para os organismos aquáticos.
- R 52 Nocivo para os organismos aquáticos.



- R 53 Pode causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático.  
R 54 Tóxico para a flora.  
R 55 Tóxico para a fauna.  
R 56 Tóxico para os organismos do solo.  
R 57 Tóxico para as abelhas.  
R 58 Pode causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente.  
R 59 Perigoso para a camada de ozono.  
R 60 Pode comprometer a fertilidade.  
R 61 Risco durante a gravidez com efeitos adversos na descendência.  
R 62 Possíveis riscos de comprometer a fertilidade.  
R 63 Possíveis riscos durante a gravidez de efeitos indesejáveis na descendência.  
R 64 Pode causar danos nas crianças alimentadas com leite materno.  
Combinação das frases R  
R 14/15 Reage violentamente com a água libertando gases extremamente inflamáveis.  
R 15/29 Em contacto com a água liberta gases tóxicos e extremamente inflamáveis.  
R 20/21 Nocivo por inalação e em contacto com a pele.  
R 20/22 Nocivo por inalação e ingestão.  
R 20/21/22 Nocivo por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.  
R 21/22 Nocivo em contacto com a pele e por ingestão.  
R 23/24 Tóxico por inalação e em contacto com a pele.  
R 23/25 Tóxico por inalação e ingestão.  
R 23/24/25 Tóxico por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.  
R 24/25 Tóxico em contacto com a pele e por ingestão.  
R 26/27 Muito tóxico por inalação e em contacto com a pele.  
R 26/28 Muito tóxico por inalação e ingestão.  
R 26/27/28 Muito tóxico por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.  
R 27/28 Muito tóxico em contacto com a pele e por ingestão.  
R 36/37 Irritante para os olhos e vias respiratórias.  
R 36/38 Irritante para os olhos e pele.  
R 36/37/38 Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele.  
R 37/38 Irritante para as vias respiratórias e pele.  
R 39/23 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação.  
R 39/24 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves em contacto com a pele.  
R 39/25 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por ingestão.  
R 39/23/24 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação e em contacto com a pele.  
R 39/23/25 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação e ingestão.  
R 39/24/25 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves em contacto com a pele e por ingestão.  
R 39/23/24/25 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.  
R 39/26 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação.  
R 39/27 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves em contacto com a pele.  
R 39/28 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por ingestão.  
R 39/26/27 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação e em contacto com a pele.  
R 39/26/28 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação e ingestão.  
R 39/27/28 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves em contacto com a pele e por ingestão.  
R 39/26/27/28 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.  
R 40/20 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis por inalação.  
R 40/21 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis em contacto com a pele.  
R 40/22 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis por ingestão.  
R 40/20/21 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis por inalação e em contacto com a pele.  
R 40/20/22 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis por inalação e ingestão.  
R 40/21/22 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis em contacto com a pele e por ingestão.  
R 40/20/21/22 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.  
R 42/43 Pode causar sensibilização por inalação e em contacto com a pele.  
R 48/20 Nocivo: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação.  
R 48/21 Nocivo: risco de efeitos para a saúde em caso de exposição prolongada em contacto com a pele.



- R 48/22 Nocivo: risco de efeitos para a saúde em caso de exposição prolongada por ingestão.
- R 48/20/21 Nocivo: risco de efeitos para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação e em contacto com a pele.
- R 48/20/22 Nocivo: risco de efeitos para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação e ingestão.
- R 48/21/22 Nocivo: risco de efeitos para a saúde em caso de exposição prolongada em contacto com a pele e por ingestão.
- R 48/20/21/22 Nocivo: risco de efeitos para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.
- R 48/23 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação.
- R 48/24 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada em contacto com a pele.
- R 48/25 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por ingestão.
- R 48/23/24 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação e em contacto com a pele.
- R 48/23/25 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação e ingestão.
- R 48/24/25 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada em contacto com a pele e por ingestão.
- R 48/23/24/25 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.
- R 50/53 Muito tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático.
- R 51/53 Tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático.
- R 52/53 Nocivo para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático.

Conselhos de prudência relativos a substâncias e preparações perigosas:

- S 1 Guardar fechado à chave.
- S 2 Manter fora do alcance das crianças.
- S 3 Guardar em lugar fresco.
- S 4 Manter fora de qualquer zona de habitação.
- S 5 Manter sob ... (líquido apropriado a especificar pelo produtor).
- S 6 Manter sob ... (gás inerte a especificar pelo produtor).
- S 7 Manter o recipiente bem fechado.
- S 8 Manter o recipiente ao abrigo da humidade.
- S 9 Manter o recipiente num local bem ventilado.
- S 12 Não fechar o recipiente hermeticamente.
- S 13 Manter afastado de alimentos e bebidas, incluindo os dos animais.
- S 14 Manter ao abrigo de... (matérias incompatíveis a indicar pelo produtor).
- S 15 Manter afastado do calor.
- S 16 Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - não fumar.
- S 17 Manter afastado de matérias combustíveis.
- S 18 Manipular e abrir o recipiente com prudência.
- S 20 Não comer nem beber durante a utilização.
- S 21 Não fumar durante a utilização.
- S 22 Não respirar as poeiras.
- S 23 Não respirar os gases/vapores/fumos/aerossóis [termo(s) apropriado(s) a indicar pelo produtor].
- S 24 Evitar o contacto com a pele.
- S 25 Evitar o contacto com os olhos.
- S 26 Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista.
- S 27 Retirar imediatamente todo o vestuário contaminado.
- S 28 Após contacto com a pele, lavar imediata e abundantemente com... (produtos adequados a indicar pelo produtor).
- S 29 Não deitar os resíduos no esgoto.
- S 30 Nunca adicionar água a este produto.



- S 33 Evitar acumulação de cargas electrostáticas.
- S 35 Não se desfazer deste produto e do seu recipiente sem tomar as precauções de segurança devidas.
- S 36 Usar vestuário de protecção adequado.
- S 37 Usar luvas adequadas.
- S 38 Em caso de ventilação insuficiente, usar equipamento respiratório adequado.
- S 39 Usar um equipamento protector para a vista/face.
- S 40 Para limpeza do chão e objectos contaminados por este produto, utilizar...(a especificar pelo produtor).
- S 41 Em caso de incêndio e/ou explosão não respirar os fumos.
- S 42 Durante as fumigações/pulverizações usar equipamento adequado [termo(s) adequado(s) a indicar pelo produtor].
- S 43 Em caso de incêndio, utilizar...(meios de extinção a especificar pelo produtor. Se a água aumentar os riscos, acrescentar «Nunca utilizar água»).
- S 45 Em casos de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).
- S 46 Em caso de ingestão, consultar imediatamente o médico e mostrar-lhe a embalagem ou o rótulo.
- S 47 Conservar a uma temperatura que não exceda...°C (a especificar pelo produtor).
- S 48 Manter húmido com...(material adequado a especificar pelo produtor).
- S 49 Conservar unicamente no recipiente de origem.
- S 50 Não misturar com...(a especificar pelo produtor).
- S 51 Utilizar somente em locais bem ventilados.
- S 52 Não utilizar em grandes superfícies nos locais habitados.
- S 53 Evitar a exposição - obter instruções específicas antes da utilização.
- S 56 Eliminar este produto e o seu recipiente, enviando-os para local autorizado para a recolha de resíduos perigosos ou especiais.
- S 57 Utilizar um recipiente adequado para evitar a contaminação do ambiente.
- S 59 Solicitar ao produtor/fornecedor informações relativas à sua recuperação/reciclagem.
- S 60 Este produto e o seu recipiente devem ser eliminados como resíduos perigosos.
- S 61 Evitar a libertação para o ambiente. Obter instruções específicas/fichas de segurança.
- S 62 Em caso de ingestão, não provocar o vômito. Consultar imediatamente um médico e mostrar-lhe a embalagem ou o rótulo.
- Combinação das frases S
- S 1/2 Guardar fechado à chave e fora do alcance das crianças.
- S 3/7 Conservar em recipiente bem fechado em lugar fresco.
- S 3/9/14 Conservar em lugar fresco e bem ventilado ao abrigo de...(matérias incompatíveis a indicar pelo produtor).
- S 3/9/14/49 Conservar unicamente no recipiente de origem, em lugar fresco e bem ventilado ao abrigo de ... (matérias incompatíveis a indicar pelo produtor).
- S 3/9/49 Conservar unicamente no recipiente de origem, em lugar fresco e bem ventilado.
- S 3/14 Conservar em lugar fresco ao abrigo de...(matérias incompatíveis a indicar pelo produtor).
- S 7/8 Conservar o recipiente bem fechado e ao abrigo da humidade.
- S 7/9 Manter o recipiente bem fechado em local bem ventilado.
- S 7/47 Manter o recipiente bem fechado e conservar a uma temperatura que não exceda ...°C (a especificar pelo produtor).
- S 20/21 Não comer, beber ou fumar durante a utilização.
- S 24/25 Evitar o contacto com a pele e os olhos.
- S 29/56 Não deitar os resíduos no esgoto, eliminar este produto e o seu recipiente, enviando-os para local autorizado para a recolha de resíduos perigosos ou especiais.
- S 36/37 Usar vestuário de protecção e luvas adequadas.
- S 36/37/39 Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para a vista/face adequados.
- S 36/39 Usar vestuário de protecção e equipamento protector para a vista/face adequados.
- S 37/39 Usar luvas e equipamento protector para a vista/face adequados.
- S 47/49 Conservar unicamente no recipiente de origem a temperatura que não exceda ...°C (a especificar pelo produtor).

## ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Deve ler-se
18	10	Tabelas 8 e 9	Tabelas 6 e 7
80	21	Tabela 11	Tabela 9